

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl Bakteriologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Die Rolle der
Tyrosinphosphorylierungsmotive
des Onkoproteins CagA
von *Helicobacter pylori*

DISSERTATION
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Florian Gilg
Aus Memmingen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Holger Rüßmann
Priv. Doz. Dr. Ursula Zimmer-Strobel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Ute Breithaupt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Bakteriologie am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Haas und PD Dr. W. Fischer im Zeitraum von April 2010 bis Januar 2014 angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung von Infektionskrankheiten	1
1.2	Entdeckung und Epidemiologie von <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.3	Pathogenese <i>H. pylori</i> assoziierter Krankheiten	2
1.4	Diagnostik und Therapie	4
1.5	Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i>	4
1.6	Die <i>cag</i> -Pathogenitätsinsel und das CagA Protein	6
1.7	Mongolischer Gerbil (<i>Meriones unguiculatus</i>) als Modelltier	8
1.8	Zielsetzung	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1	Material	10
2.1.1	Bakterienstämme	10
2.1.2	Zelllinie	12
2.1.3	Plasmide und Vektoren	12
2.1.4	Oligonukleotide	13
2.1.5	Antikörper	14
2.1.6	Enzyme und Proteine.....	15
2.1.7	Molekulargewichtsmarker	15
2.1.8	Nährmedien und Platten	15
2.1.9	Antibiotika und Zusätze	16
2.1.10	Puffer und Lösungen	16
2.1.11	Chemikalien.....	18
2.1.12	Geräte und Apparaturen	18
2.1.13	Verbrauchsmittel	19
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Arbeiten mit Tieren	19
2.2.2	Arbeiten mit Bakterien	20
2.2.3	Arbeiten mit Zellkulturen	22
2.2.4	Arbeiten mit DNA	24
2.2.5	Arbeiten mit Proteinen	28
2.2.6	IL8-ELISA.....	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Gerichtete Mutagenese von chromosomalem <i>cagA</i>.....	32
3.1.1	Platzierung der <i>rpsL-erm</i> -Kassette in der EPIYA-Region von <i>cagA</i>	33
3.1.2	Konstruktion der <i>cagA</i> 3' <i>repeat regions</i> mit unterschiedlicher Anzahl an EPIYA Motiven	34
3.1.3	Transformation der Konstrukte pFG1 und pFG2	34
3.2	Komplementation mit mutagenisiertem <i>cagA</i> mittels intrinsischem Plasmid	36
3.2.1	Herstellung der <i>cagA</i> Varianten auf dem Plasmid pLH	36
3.2.2	Transformation der Plasmide in <i>H. pylori</i> <i>cagA</i> -Deletionsmutanten	37

3.2.3	Kolonisierungsversuche im Mongolischen Gerbil	40
3.3	Charakterisierung klinischer <i>H. pylori</i> Isolate	41
3.3.1	Kolonisierung im Mongolischen Gerbil	41
3.3.2	Expressionsanalysen von <i>cagA</i> und <i>vacA</i> Genen	42
3.3.3	Genetische Kartierung der <i>cagA</i> und <i>vacA</i> Sequenzen	44
3.3.4	CagA Tyrosinphosphorylierung	46
3.3.5	Il-8 Induktion <i>in vitro</i>	46
3.3.6	Nigerianisches Patientenisolat <i>H. pylori</i> 1-20A	48
3.3.7	Zusammenfassung der Charakterisierung verwendeter Stämme	50
4	DISKUSSION	52
4.1	Klonierungen in <i>H. pylori</i> B8.....	52
4.2	Kolonisierungsfähigkeit von <i>H. pylori</i> B8.....	53
4.3	Einordnung der Arbeit im Kontext zur aktuellen Literatur.....	57
4.4	Ausblick.....	58
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	59
6	LITERATURVERZEICHNIS	60
7	ANHANG	70
8	LEBENS LAUF FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
9	DANKSAGUNGEN.....	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Prozentuale Verteilung der durch Infektionen verursachten Krebsfälle in Deutschland.....	3
Abb. 1.2: Auswirkungen der CagA-Translokation auf die zellulären Prozesse der Wirtszelle	7
Abb. 1.3: Diversität der Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von CagA	8
Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Infektion von <i>M. unguiculatus</i>	20
Abb. 2.2: Schematische Darstellung einer <i>overlap</i> -PCR	26
Abb. 3.1: Die Zwei-Gen-Kassette <i>rpsL-erm</i>	32
Abb. 3.2: Das Plasmid pGR15	33
Abb. 3.3: Western Blot zur Detektion von CagA nach Transformation von pFG1 in B8-15.....	35
Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung der PCR-Amplifikation des <i>cagA</i> Genlokus nach Transformation von pFG1	35
Abb. 3.5: Das Plasmid pLH2	37
Abb. 3.6: Das Plasmid pEL1 zur Herstellung von <i>H. pylori</i> - <i>cagA</i> -Deletionsmutanten.....	38
Abb. 3.7: Darstellung des Plasmides pHel12 des Stammes P12 mit seinen einzelnen <i>open reading frames</i> und des jeweiligen inserierten <i>cagA</i> der daraus entstehenden Plasmide pHel274 und pHel275.....	38
Abb. 3.8: Western Blot auf CagA einiger Klone von B8 Δ <i>cagA</i> 274 und B8 Δ <i>cagA</i> 275	39
Abb. 3.9: PCR mit Nachweis von <i>cagA</i> und pHel der Mutanten B8 Δ <i>cagA</i> 274 und B8 Δ <i>cagA</i> 275	39
Abb. 3.10: Phosphotyrosinblot der Mutanten B8 Δ <i>cagA</i> 274 und B8 Δ <i>cagA</i> 275	40
Abb. 3.11: RAPD – PCR der Reisolat des Karolinska Mix 1	42
Abb. 3.12: Western Blot auf CagA, Karolinska Stämme.....	43
Abb. 3.13: Western Blot auf VacA, Karolinska Stämme.....	43
Abb. 3.14: Amplifikation und Einteilung der <i>vacA signal region</i> , Karolinska Stämme.....	45
Abb. 3.15: Amplifikation und Einteilung der <i>vacA midregion</i> , Karolinska Stämme	45
Abb. 3.16: Amplifikation und Einteilung der <i>vacA intermediate region</i> , Karolinska Stämme.....	45
Abb. 3.17: CagA Tyrosinphosphorylierung, Karolinska Stämme	46
Abb. 3.18: IL-8 Induktion in AGS-Zellen nach Inkubation mit den Karolinska Stämmen.....	47
Abb. 3.19: Graphische Auswertung der Kolonisierungsversuche im Gerbil der <i>H. pylori</i> -Nigeria-Isolate.....	48

Abb. 3.20: RAPD – PCR der Nigeria-Isolate des Infektionssets 1	49
Abb. 4.1: B8 $\Delta cagA$ Mutanten, die nicht mehr im Gerbil kolonisieren	55
Abb. 4.2: B8 Mutante <i>cagA::catGC</i>	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten <i>E.coli</i> -Stämme inklusive deren Herkunft	10
Tab. 2.2: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten <i>H. pylori</i> -Stämme inklusive deren Herkunft	12
Tab. 2.3: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide inklusive deren Referenz	14
Tab. 3.1: Tabellarische Auswertung der Kolonisierungsversuche mit Karolinska Mix 1	42
Tab. 3.2: Zusammenfassung der Charakteristika von <i>H. pylori</i> 1-20A	50
Tab. 3.3: Zusammenfassung der Charakteristika der klinischen <i>H. pylori</i> Isolate des Karolinska Institutes.....	51
Tab. 4.1: Kolonisierungsversuche der B8 (EL-H5) Deletionsmutanten	56

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung von Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten sind der Menschheit seit Jahrtausenden phänomenologisch bekannt. Einzig ihr Ursprung blieb lange unentdeckt. Auf Einwirkung höherer Mächte, oder später als Folge von mit Dämpfen und Dünsten verunreinigter Luft wurden sie zurückgeführt. Im Zuge der Pestepidemien des 14. Jahrhunderts erkannte man die direkte Übertragbarkeit mancher Krankheiten und die Begriffe Kontagiösität und Quarantäne wurden geboren. Selbst durch die Erfindung des Mikroskops durch den niederländischen Arzt Antoni van Leeuwenhoeck und dem visuellen Beweis von Mikrolebewesen blieb der kausale Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Seuchen und dem Nachweis von Mikroorganismen unklar. Erst Mitte des 19. Jahrhunderts konnte der französische Chemiker Louis Pasteur eine Verbindung zwischen Erreger und Krankheitsbild zeigen und entwickelte daraufhin Impfstoffe mit abgeschwächten Krankheitskeimen. Die von Robert Koch erweiterten Henleschen Thesen zur Ursächlichkeit von Infektionskrankheiten bilden noch heute den wissenschaftlichen Goldstandard der Infektionslehre.

Die Moderne Medizin scheint in weiten Bereichen im Heilen von Infektionskrankheiten an ihre Grenzen zu stoßen. Genetische Plastizität von Bakterien und Viren führt zur Ausbildung von Resistenzmechanismen gegen die uns bekannten Antibiotika, so dass sie oft nicht kausal zu therapieren sind. Die immensen Auswirkungen von Pandemien wie beispielsweise der Spanischen Grippe von 1918 mit ca. 50 Millionen Toten [71] und die ernst zu nehmenden Bedrohungen durch Keime, wie etwa der EHEC-Ausbruch in Deutschland im Mai 2011 [86], stellt an die wissenschaftliche Forschung den Anspruch Mikroorganismen besser zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln.

1.2 Entdeckung und Epidemiologie von *Helicobacter pylori*

Im Jahr 1982 wurde an der Universität in Perth durch Zufall ein „neues“ Bakterium entdeckt. Seine Entdecker, die Mediziner Marshall und Warren, beschrieben es als „*unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*“. Das gramnegative, polar begeißelte, mikroaerophile Bakterium wurde zunächst als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet [68]. Durch einen Selbstversuch erfüllte Marshall die Koch'schen Postulate, indem er zeigte, dass

Campylobacter pyloridis nach der Kolonisierung der Magenschleimhaut zu einer schweren Gastritis führt [67]. Dieser Beweis revolutionierte die damalige Vorstellung, Stress, ungesunde Ernährung und Rauchen allein seien für Magenschleimhautentzündungen und Magengeschwüre verantwortlich und widerlegte die Vorstellung des Magens als lebensfeindliches Habitat. Angesichts der biochemischen und ultrastrukturellen Eigenschaften dieses Bakteriums wurde 1989 die neue Gattung *Helicobacter* eingeführt. Im Jahr 1994 stufte die World Health Organisation (WHO) *H. pylori* als Kanzerogen der Gruppe I ein. Barry James Marshall und John Robin Warren wurden 2005 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin für ihre Entdeckung geehrt.

H. pylori ist in allen Teilen der Erde verbreitet und gehört mit einer Prävalenz von ca. 50 % zu den häufigsten chronisch bakteriellen Infektionen [108]. Eine Infektion mit *H. pylori* kann in allen Gesellschaften und Gesellschaftsschichten gefunden werden: sind in den Entwicklungsländern 70-90 % der Bevölkerung infiziert, liegt die Durchseuchungsrate in den Industrieländern bei 20-50 % [28]. Im Fall der Industrienationen ist die Prävalenz durch verbesserte Hygienebedingungen und das Zusammenleben in kleineren Familien seit Mitte des 19. Jahrhunderts rückläufig [94, 113]. Zudem wurde eine negative Korrelation von Krankheitshäufigkeit und sozioökonomischem Status beobachtet [64]. Abgesehen davon wird zusätzlich über unbekannte prädispositionierende genetische Faktoren diskutiert [22, 77]. Da etwa ab dem 20. Lebensjahr die Prävalenz innerhalb einer Geburtskohorte stabil bleibt [15, 34, 103], wird von einer in der Regel frühkindlichen Infektion ausgegangen [28], auch weil das Neuinfektionsrisiko im Erwachsenenalter gering ist [74]. Hier dürften intrafamiliäre, oral-orale und fäkal-orale Infektionswege ausschlaggebend sein [31, 91, 92]. Vor allem in Entwicklungsländern spielt kontaminiertes Wasser als Übertragungsmedium eine Rolle [55].

1.3 Pathogenese *H. pylori* assoziierter Erkrankungen

H. pylori besitzt zwei bis sechs Geißeln, die es dazu befähigt sich aktiv durch die Schleimschicht hindurch Richtung Magen-Mukosa zu bewegen, wo ein neutralerer pH-Wert und damit günstigere Bedingungen herrschen als im Magenlumen. Der Großteil der oral aufgenommenen Bakterien verbleibt dabei im Mukus [98, 102]. Dort kann der Erreger durch Adhäsine an den Magenzellen in Antrum und Korpus anhaften. Mittels verschiedener Virulenzfaktoren (siehe Kapitel 1.5) persistiert das Bakterium über Jahrzehnte im Wirt und kann entzündliche Veränderungen der Magenschleimhaut hervorrufen. Der Primäraffekt in Form einer akuten Gastritis (Magenschleimhautentzündung) verläuft in ca. 90 % der Fälle asymptomatisch. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit einer Selbsteradikation durch den Wirt

entwickelt sich der Infekt über Monate zu einer aktiven chronischen Gastritis, die ebenfalls in den meisten Fällen blande verläuft [104]. Nur 15 bis 20 % der infizierten Personen entwickeln infolge dieser chronischen TypB-Gastritis Folgeerkrankungen wie chronische atrophische Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, Magenkarzinome oder ein „*mucosa associated lymphoid tissue*“ (MALT)-Lymphom [9]. Dennoch sind in Deutschland bei Frauen ca. 26 % und bei Männern sogar ca. 47 % der durch Infektionen verursachten Krebsfälle auf *H. pylori* zurückzuführen (Abb. 1.1)

Als Antwort auf die *H. pylori*-Infektion sekretieren Epithelzellen der Magenschleimhaut vermehrt proinflammatorische Zytokine [16], das erworbene Immunsystem reagiert mit B- und T-Zell-Antwort. Neben Umweltfaktoren bestimmen stammspezifische Faktoren des Bakteriums und genetische Determinanten des Wirtes die Schwere und den Verlauf der Pathogenese [17, 29].

Etwa 72-98 % der Patienten mit MALT-Lymphom sind mit *H. pylori* infiziert [82, 118]. Zwölffingerdarmgeschwüre sind die Folge einer im Antrum lokalisierten Gastritis, welche durch erhöhte Säureproduktion und eine leichte Entzündung des Korpus charakterisiert ist. Magengeschwüre oder -krebs entstehen aufgrund einer starken Entzündung des Korpus und sind mit multifokaler Atrophie (Gewebeschwund) assoziiert. Die Säureproduktion ist hier wegen der Zerstörung der Säure-produzierenden Parietalzellen gering [3]. Der Übergang einer chronischen, *H. pylori*-induzierten Entzündung zu schwereren Krankheitsbildern wie Magenkrebs zeigt sich dabei erst nach Jahrzehnten.

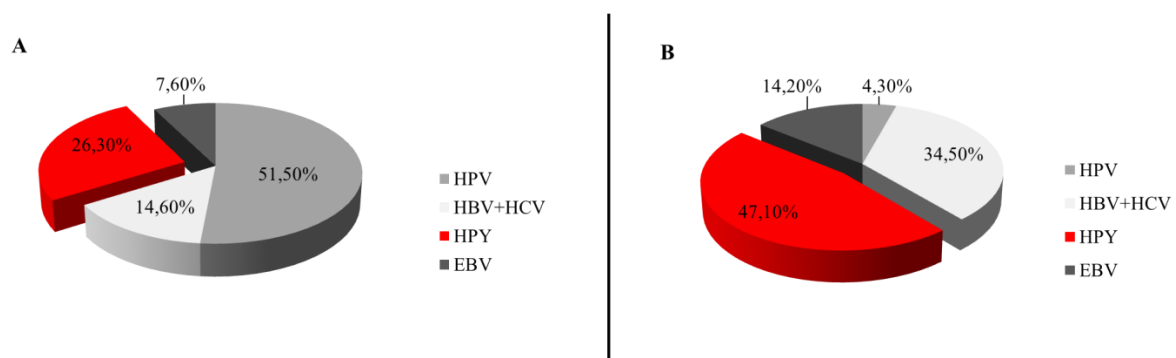


Abb. 1.1: Prozentuale Verteilung der durch Infektionen verursachten Krebsfälle in Deutschland

Etwa 20 % der globalen Tumorinzidenz sind durch Infektionen bedingt. Der relative Anteil der bedeutendsten Infektionen ist in der folgenden Abbildung für Frauen und Männer wiedergegeben. HPV: Humane Papillomaviren; HBV/HCV: Hepatitis-B/C-Virus; HPY: *Helicobacter pylori*; EBV: Epstein-Barr-Virus

A: Verteilung der Krebsfälle nach Infektionen bei Frauen

B: Verteilung der Krebsfälle nach Infektionen bei Männern

Quelle: <http://www.dkfz.de/de/tumorvirus-charakterisierung/projekte.html>

Über mögliche vorteilhafte Effekte einer *H. pylori*-Infektion wird kontrovers diskutiert. Studien belegen eine substantielle Risikoreduktion (>50 %) für Reflux-Ösophagitis (*gastroesophageal reflux disease*, GERD), Barrett-Ösophagus und Speiseröhrenkrebs. Die genauen Mechanismen dieser Effekte sind noch nicht eindeutig geklärt [5]. Im Mausmodell zeigt sich bei neonataler Infektion mit *H. pylori* eine signifikante Risikoreduktion für die Ausbildung von Allergie-assoziiertem Asthma bronchiale [8].

1.4 Diagnostik und Therapie

In der *H. pylori* Diagnostik steht ein breites Spektrum an nicht invasiven Tests, wie der ¹³C-Harnstoff-Atemtest, der Stuhlantigennachweis und Antikörper-Test, und invasiven Methoden zur Verfügung [25]. Der aussagekräftigste Nachweis ist nach wie vor die mikrobiologische, histologische und biochemische Analyse einer Magenbiopsie. Dabei wird der Keim durch Anzucht direkt nachgewiesen und es kann gegebenenfalls vor einer Behandlung des Patienten auf vorhandene Antibiotikaresistenzen getestet werden.

Asymptomatische *H. pylori* Träger werden in der Regel nicht therapiert. Empfohlen wird eine Eradikationstherapie bei Ulkuspatienten, bei Patienten mit einer *H. pylori* assoziierten symptomatischen Gastritis oder einem MALT-Lymphom, sowie nach der Operation eines Magenkarzinoms [12, 65]. Durch die Eradikation des Keims erfolgt ein vollständiges Ausheilen der Gastritis und auch das Risiko eines Ulkus-Rezidivs wird minimiert [31].

Die höchste Erfolgsquote von über 90 % kann mit einer Tripel-Therapie erreicht werden. Dabei werden ein Protonenpumpenhemmer, wie Omeprazol, und zwei Antibiotika, z.B. Amoxicillin und Clarithromycin bzw. Metronidazol, über einen Zeitraum von einer Woche verabreicht. Bei vorhandener Resistenz gegen eines der verabreichten Antibiotika ist eine starke Reduktion des Therapieerfolges festzustellen. So sinkt die Erfolgsrate im Fall einer Resistenz gegen das Antibiotikum Clarithromycin um ca. 50 % [51]. Aufgrund der zunehmenden Verbreitung von Resistenzen wird die Entwicklung von Impfstoffen vorangetrieben [50, 58, 72]

1.5 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

H. pylori hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um den sauren Bedingungen im menschlichen Magen und der Immunantwort des Wirtes zu trotzen. Auf die wichtigsten Virulenzfaktoren wird im Folgenden eingegangen.

Das heterooligomere Enzym Urease katalysiert die Umsetzung von Harnstoff, der in geringer Menge im Magenumen vorkommt, zu Kohlendioxid und Ammoniak. Die Produkte fangen in

der unmittelbaren Umgebung des Bakteriums Protonen ab und ermöglichen ihm das kurzzeitige Überleben bei extrem niedrigen pH-Werten [39, 40, 41].

Superoxiddismutase (SOD) und Katalase wandeln reaktive Sauerstoffmetabolite von Phagozyten des angeborenen Abwehrsystems in Wasserstoffperoxid um und neutralisieren diesen [46, 79].

Zusammen mit seiner helikalen Morphologie vermitteln die aus den Flagellinen FlaA und FlaB zusammengesetzten, polar lokalisierten Flagellen die Motilität von *H. pylori* in Richtung Bicarbonat-gepuffertem Magen-Mucus. Der pH-Gradient dient dabei der chemotaktischen Orientierung [63, 98, 120].

Outer membrane proteins (OMP), wie AlpA/B, BabA, SabA, vermitteln Adhäsion an Magenepithelzellen und verhindern damit den Abtransport der Bakterien durch Peristaltik und Mukus-Erneuerung. Diese Proteine werden als Adhäesine bezeichnet.

VacA ist ein mit der Ulkuserkrankung assoziiertes, sekretiertes Zytotoxin, welches *in vitro* eine Vakuolisierung von Zellen auslöst. Auf zellulärer Ebene inhibiert VacA den intrazellulären Vesikeltransport, die Antigenpräsentation in B-Zellen, bewirkt die Lockerung der *tight junctions* zwischen den Zellen, hemmt die IL-2 Sekretion in T-Zellen und besitzt apoptotische Wirkung [23, 36].

Das von der *cag* Pathogenitätsinsel kodierte Protein CagA wird durch den Cag Typ IV-Sekretionsapparat in verschiedene eukaryotische Zellen transloziert und ist mit der Entstehung von gastrointestinalen Ulzera, dem Magenkarzinom und MALT-Lymphom assoziiert (siehe Kapitel 1.6).

Während Pathogenitätsfaktoren wie Urease und Flagellen essentiell sind und ubiquitär in *H. pylori* Stämmen vorkommen sind andere, z.B. die *cagPAI*, nicht immer zu finden. Auch VacA Allele sind in allen Stämmen vorhanden, wobei man die Sequenz in drei Bereiche unterteilen kann. Die Signalsequenz, die Mittelregion und die Intermediärregion. Jeder der drei Bereiche kann in zwei verschiedenen Unterformen vorkommen (s1/s2; m1/m2; i1/i2). In zahlreichen epidemiologischen Studien wurden die verschiedenen *vacA*-Allel-Typen mit der klinischen Ausprägung der durch sie verursachten oberen gastrointestinalen Krankheiten untersucht [10, 93]. Die Allel-Kombinationen s1/m1/i1 und s1/m2/i1 wurden am häufigsten im Zusammenhang mit Adenokarzinomen isoliert, wobei hier vor allem die intermediäre Region ausschlaggebend zu sein scheint [89].

1.6 Die *cag*-Pathogenitätsinsel und das CagA Protein

Als „Insel“ wird in der Bakteriologie ein Block neuintegrierter DNA verstanden, der durch horizontalen Gentransfer, etwa durch Phagen-Injektion oder über homologe Rekombination, in das Erbgut des Bakteriums integriert wurde. Sie weichen in ihrem GC-Gehalt von der ursprünglichen DNA des Prokaryoten ab und codieren als *pathogenicity islands* (PAI) Virulenzfaktoren wie Adhäsine, Invasine und Toxine [41].

H. pylori Stämme, die eine ca. 40 kb große PAI besitzen werden als TypI Stämme bezeichnet. Abgegrenzt werden sie gegen die TypII Stämme, in deren Genom sich keine PAI befindet. TypI Stämme werden häufiger in Patienten mit schweren *H. pylori*-assoziierten Gastroduodenalkrankheiten nachgewiesen, wohingegen symptomlose Infektionen meist auf Stämme ohne PAI zurückzuführen sind [20]. Die Pathogenitätsinsel besitzt 31 offene Leserahmen, die unter anderem für ein Typ IV Sekretionssystem (T4SS) und das Effektorprotein CagA codieren. Ein am Magenepithel adhärenter *H. pylori* ist mit einem funktionellen T4SS in der Lage, das 128-145 kDa große Protein CagA in die Wirtszelle einzuschleusen [14, 21, 78]. Per Röntgenstrukturanalyse konnte die Tertiärstruktur des Proteins gezeigt werden [45, 53]. In der Wirtszelle wird das Protein, welches ein oder mehrere Tyrosinphosphorylierungsmotive (sog. EPIYA Motive) enthält, durch Protein-Tyrosin-Kinasen der Wirtszelle erkannt und phosphoryliert [85, 100]. Phosphoryliertes CagA (CagA^{P-Tyr}) führt zur Dephosphorylierung verschiedener Wirtszellproteine [55, 58, 59], sowie zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und es beeinträchtigt die Integrität epithelialer Zell-Zell-Kontakte (sog. *tight junctions*) [4]. Dabei entstehen zum einen charakteristische Zellausläufer, morphologisch als *hummingbird*-Phänotyp bezeichnet, zum anderen kommt es zu einem Auseinanderweichen der Epithelzellen, dem sogenannten *cell scattering* [13, 19, 47]. Diese Effekte beruhen zu großen Teilen auf der Interaktion zwischen CagA und der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2. CagA^{P-Tyr} bindet an die *SRC homology 2 (SH2) – Domain* von SHP2 und stimuliert dessen Phosphatase-Aktivität [44]. SHP2 greift in zelluläre Signaltransduktionswege ein, die von Wachstumsfaktoren und Zytokin-Rezeptoren ausgehen. Des Weiteren ist die Phosphatase Mitregulator von Zellproliferation und -motilität und Taktgeber mitotischer Signalwege wie dem *RAS-MAPK pathway* (Abb. 1.2) oder dem Wnt-Signalweg [35, 66, 109, 121].

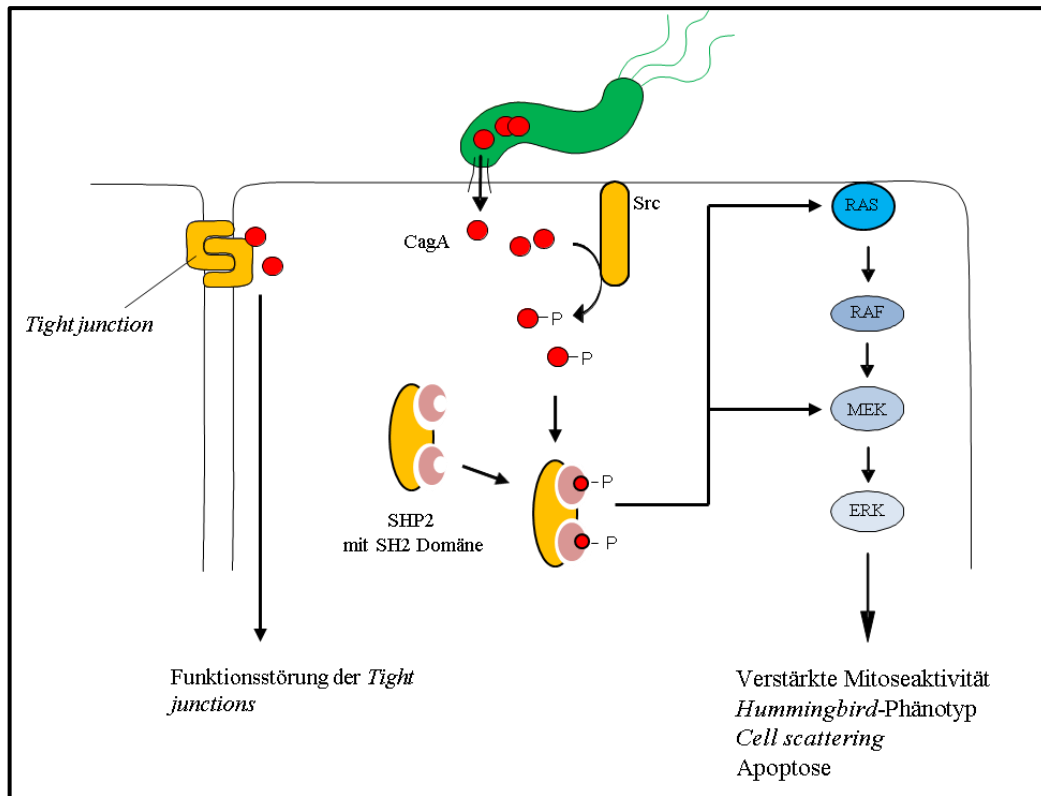


Abb. 1.2: Auswirkungen der CagA-Translokation auf die zellulären Prozesse der Wirtszelle

Am Magenepithel adhärente *H. pylori* translozieren über das Typ 4 Sekretionssystem das Effektorprotein CagA, welches an seinen EPIYA Motiven von Kinasen der SRC-Familie phosphoryliert wird. Es interagiert mit SHP2 und aktiviert somit die Ras/MEK/ERK Kaskade. Des Weiteren führt die Anlagerung des CagA-Proteins an Komponenten der *tight junctions* zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere. (SHP-2: *tyrosine phosphatase containing Src-homology 2 domain*; Ras: *Rat sarcoma*; MEK: *MAP kinase kinase*, ERK: *extracellular signal-regulated kinase*).

Die Tyrosin-Phosphorylierung von CagA findet an den EPIYA Motiven, eine 5-Aminosäuren-Sequenz (Glu-Pro-Ile-Tyr-Alu) der C-terminalen, variablen Region von CagA, statt. Anhand der umgebenden Aminosäure-Sequenz können die EPIYA Motive in EPIYA-A, -B, -C, -D kategorisiert werden (Abb. 1.3). Stämme, die in westlichen Ländern isoliert werden besitzen vornehmlich ein oder mehrere EPIYA-C Motive, die auf ein EPIYA-A und ein EPIYA-B Motiv folgen (*Western CagA*). *East-Asian CagA*, wie es z.B. in Japan, Korea und China verbreitet ist, besitzt neben EPIYA-A und -B Motiven das EPIYA-D Motiv [48].

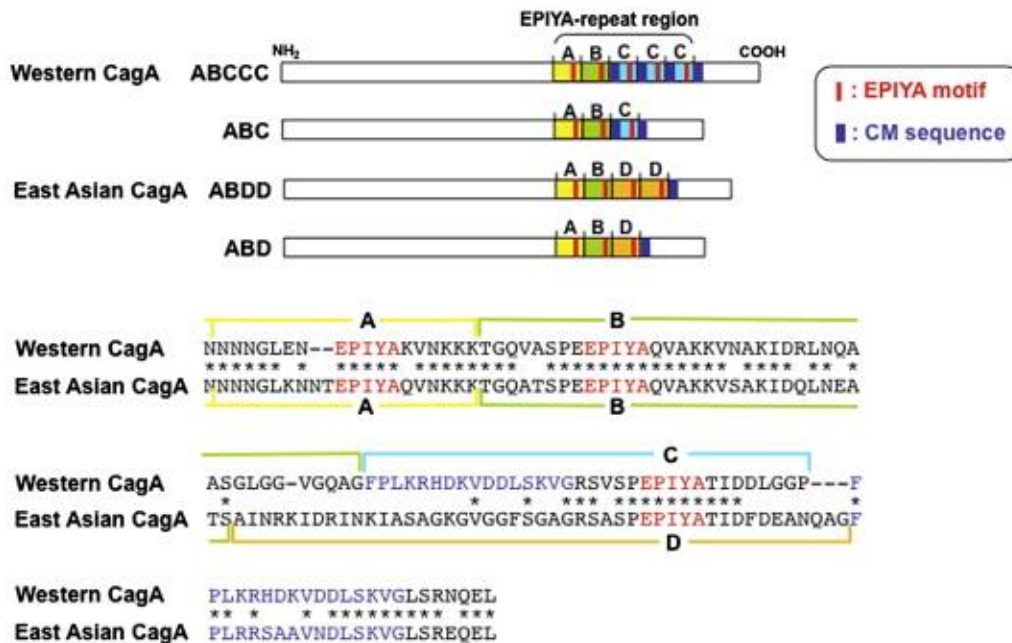


Abb. 1.3: Diversität der Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von CagA

Western CagA besitzt 1-3 Wiederholungen von EPIYA-C Motiven, welches beim East-Asian CagA durch ein EPIYA-D Motiv ersetzt ist. Unten sind die spezifischen umrandenden Sequenzen dargestellt.

Abbildung entnommen aus: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457911000943> [76]

1.7 Mongolischer Gerbil (*Meriones unguiculatus*) als Modelltier

Die Rennmäuse (Gerbillinae) sind in der Familie der Langschwanzmäuse subsummiert und sind in den Wüsten und Steppen Afrikas und Asiens beheimatet. Bis der Mongolische Gerbil als Modelltier für experimentelle *H. pylori* Forschung eingesetzt wurde, wurden diverse andere Tiere (Maus, Hauskatze, Ferkel, Affe) als *in vivo* Modelle getestet. Schwierige, artgerechte Haltung in ausreichender Stückzahl oder geringe Infektionsraten sind gegenüber dem *M. unguiculatus* deutliche Nachteile [27, 37, 61].

H. pylori führt bei infizierten Tieren zu schwerer Gastritis. Vier Wochen *post infectionem* zeigen sich im gefärbten histologischen Schnitt Einwanderungen von polymorphkernigen Granulozyten und anderen Zellen des Immunsystems in die Submukosa und Lamina propria der Magenschleimhaut. Ulcerationen bis unter die Lamina muscularis mucosae der antralen Schleimhaut können 16 Wochen nach der Infektion beobachtet werden [70]. Für die Untersuchung von Magenkarzinomen ist der Gerbil ein gutes Modell, da die metaplastischen, intestinalen, präkanzerösen Veränderungen der Schleimhaut nach mehrmonatiger Infektionsdauer denen des Menschen morphologisch sehr ähnlich sind [38, 49]. Voraussetzung für diese pathologischen Veränderungen ist eine Infektion mit *H. pylori* Stämmen, die über

eine intakte *cagPAI*, im Speziellen über ein funktionelles T4SS, verfügen [114]. Diskutiert wird noch ob im Tier ein solides Adenokarzinom entstehen kann, da die metaplastischen Veränderungen nicht als alleiniges Kriterium einer Krebsdiagnose genügen können [30, 122]. Jedoch bleibt anzumerken, dass das Gerbil-Modell die Veränderungen bei einer *H. pylori* Infektion im Menschen nicht vollständig darstellen kann. So zeigt sich bei den Mongolischen Wüstenrennmäusen eine Hyperplasie der Lymphfollikel in der Submukosa und eine *Gastritis cystica profunda*, welche beide nicht bei infizierten Menschen anzutreffen sind [57].

1.8 Zielsetzung

H. pylori ist mittels eines spezifischen Sekretionssystems in der Lage ein toxisches Protein in Wirtszellen zu injizieren. Das translozierte Effektorprotein CagA trägt maßgeblich zu den pathologischen Auswirkungen einer *H. pylori* Infektion bei. Die intrazelluläre Phosphorylierung von CagA führt dazu, dass das Protein mit zusätzlichen Wirtszellproteinen interagiert. Die Anzahl an Tyrosinphosphorylierungsstellen am Protein variiert zwischen den einzelnen Stämmen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von *H. pylori* Mutanten eines im Tiermodell des Mongolischen Gerbils kolonisierenden Stammes. Es sollte ein Stamm hergestellt werden, der fünf Phosphorylierungsstellen aufweist, ein weiterer Stamm sollte den Pathogenitätsfaktor ohne Phosphorylierungsstellen exprimieren. Die Mutanten sollten anschließend *in vitro* und im Tiermodell auf Kolonisierungsfähigkeit und Pathogenität untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F-Φ80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44 λ- thi-l gyr A96 relA1</i> (Invitrogen)	Hanahan, 1983 [42]
One Shot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (Invitrogen)	Grant, 1990 [40]

Tab. 2.1: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten *E.coli*-Stämme inklusive deren Herkunft

2.1.1.2 *Helicobacter pylori*-Stämme

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stämme aufgelistet

Name	Stamm	Genotyp und Referenz
1-20A		Klinisches Isolat von Dr. Stella Smith, Nigerian Institute for Medical Research (Lagos, Nigeria)
B8	B128	Adaptiert an Mongolischen Gerbil, Strep ^R [90]
B8-15	B128	B8 mit <i>rpsL-erm</i> -Kassette im C-terminalen Bereich von <i>cagA</i> , Ery ^R , Strep ^S (Diese Arbeit)

Name	Stamm	Genotyp und Referenz
B8ΔcagA	B128	B8 ohne genomische <i>cagA</i> -Sequenz
P12	P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg [96]
P12ΔcagA	P12	Stamm P12 mit Deletion von <i>cagA</i> , Kan ^R [85]
P259		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P267		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P269		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P270		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P271		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P272		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P273		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P274		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)
P275		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)

Name	Stamm	Genotyp und Referenz
		Biology; Professor Lars Engstrand)
P276		Klinisches Isolat des Karolinska Institutes in Solna, Schweden (Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology; Professor Lars Engstrand)

Tab. 2.2: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten *H. pylori*-Stämme inklusive deren Herkunft

2.1.2 Zelllinie

Es wurde die humane Magenkarzinomzelllinie AGS (ATCC CRL 1739) verwendet.

2.1.3 Plasmide und Vektoren

Pbluescript II SK+	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1(+)}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/ reverse Primerbindungsstellen Amp ^R (Stratagene)
pCR2.1-TOPO	<i>ori_{colE1}</i> , <i>ori_{f1}</i> , <i>lacZ</i> , M13 forward-/reverse- und T7-Promotor- Primerbindungsstellen, Amp ^R , Kan ^R (Invitrogen)
pEL1	pBluescript mit <i>apha3</i> -Kassette (Kan ^R) und flankierenden <i>cagA</i> - homologen Regionen, zur Herstellung von B8Δ <i>cagA</i> -Mutanten
pFG1	pCR2.1-TOPO mit <i>cagA</i> EPIYA-Region (fünf EPIYA Motive)
pFG2	pCR2.1-TOPO mit <i>cagA</i> EPIYA-Region (fünf EPIFA Motive)
pGR15	pBluescript mit <i>rpsL</i> -erm-Kassette
pHel12	<i>H. pylori</i> P12 WT Plasmid
pHel274	pHel12 mit <i>cagA</i> mit 5 EPIYA Motiven
pHel275	pHel12 mit <i>cagA</i> mit 5 EPIFA Motiven
pLH	pSMART HC Kan Vector (Lucigen) mit pHel12-homologen Sequenzen
pLH274	pLH mit WT <i>cagA</i> aus <i>H. pylori</i> NCTC 11637 (5 EPIYA)
pLH275	pLH mit <i>cagA</i> aus <i>H. pylori</i> NCTC 11637 mit Punktmutationen im <i>cagA</i> (5 EPIYA → 5 EPIFA)
pRH-H274	pHel3 mit WT <i>cagA</i> aus <i>H. pylori</i> NCTC 11637 (5 EPIYA)
pRH-H275	pRH274 mit Punktmutationen im <i>cagA</i> (5 EPIYA → 5 EPIFA)

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Biomers (Ulm) bezogen und sind im Folgenden aufgelistet.

Name	Sequenz (5' → 3')	Referenz
C1R	TTAATTTAACGCTGTTTGAAG	<i>vacA</i> Genotypisierung [89]
C2R	GATCAACGCTCTGATTGA	<i>vacA</i> Genotypisierung [89]
CAGTR	GCTTTAGCTTCTGAYACYGC	<i>vacA</i> Genotypisierung [119]
FG001	AAACTTCAATAAAGCTGTAG	Diese Arbeit
FG002	GAGCTTGAGCCACTCAGGG	Diese Arbeit
FG003	TCCCGCTTGCCCTACACC	Diese Arbeit
FG004	CTCAGTAAGGTAGGGCGATC	Diese Arbeit
FG005	AGGTCCGCCGAGATCATCAATC	Diese Arbeit
FG006	GTAGGGCTTTCAAGGAATC	Diese Arbeit
UB09	ACCAACGCCTCCAAGAGTC	Diese Arbeit
UB10	CACAAAGCCAGACTTAATGTC	Diese Arbeit
UB37	GACTAACCCACTGCCGTTTTTCATGTGC ACATTAATG	Diese Arbeit
UB38	GTGGCTACACTCATTAATGTGCACATGA AAAACG	Diese Arbeit
VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	<i>vacA</i> Genotypisierung[10]

Name	Sequenz (5' → 3')	Referenz
VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	<i>vacA</i> Genotypisierung[10]
VacF1	GTTGGGATTGGGGGAATGCCG	<i>vacA</i> Genotypisierung[89]
VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	<i>vacA</i> Genotypisierung[11]
VAG-R	GCGTCAAAATAATTCCAAGG	<i>vacA</i> Genotypisierung[11]
1314	CAGGTACCGCGGCCGCTTAAGATTTTG GAAACCAC	Diese Arbeit
1315	AGCATATGACTAACGAAACCATTAAC	Diese Arbeit
1857	CCGGATCCGTGATGCGGTGCG	Diese Arbeit
1890	AGCGGCAAATTTTCTGTCA	Diese Arbeit
1891	CCGACTATAGTTATTGCTAT	Diese Arbeit
WS423	ACCGCTCGAGAACCCTAGTCGGTAATG GG	<i>vacA</i> Genotypisierung[119]

Tab. 2.3: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide inklusive deren Referenz

2.1.5 Antikörper

Im Nachfolgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für Western Blot und ELISA aufgelistet.

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Western Blot

α -CagA (AK257)	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale CagA-Hälfte von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen) (W. Fischer)
α -CagA (AK268)	Polyklonales Antiserum gegen die N-terminale CagA-Hälfte von <i>H. pylori</i> P12 (Kaninchen) (J. Püls)
α -P-Tyr (PY99)	Monoklonaler Antikörper (IgG _{2b}) gegen Phosphotyrosin (Maus)

(Santa Cruz Biotechnologies)

α -VacA (AK197) Polyklonales Antiserum gegen VacA Aminosäuren 97-723
(Kaninchen) (W. Fischer)

ELISA

α -IL-8 (G 265-5) Monoklonaler Antikörper (IgG_{2b}) gegen humanes IL-8 (Maus),
Pharmingen

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Western Blot

Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG
(Kaninchen) (Dianova)

ELISA

G265-8 Biotin-gekoppelter monoklonaler Antikörper (IgG_{2b}) gegen humanes IL-8 (Maus),
(Pharmingen)

2.1.6 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase shrimp (Fermentas); *DpnI*-Endonuklease; AP-gekoppeltes Protein A
(Sigma); Fötales Kälberserum (FCS) (PAA); Lysozym (Fluka/Sigma); Pferdeserum (PAA);
Pfu-DNA-Polymerase (Fermentas); Proteinase K (Merck); Restriktionsenzyme (Roche);
Rinderserumalbumin (BSA) (Biomol); RNase (QIAGEN); Taq-DNA-Polymerase (TaKaRa);
T4-DNA-Ligase (Roche);

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

Protein-Gelelektrophorese:	BenchMark™ Protein Ladder (invitrogen)
	Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)
	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)
DNA-Gelelektrophorese:	GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas)
	GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder (Fermentas)

2.1.8 Nährmedien und Platten

LB-Medium:	20 g/l Lennox-L-Broth (Gibco) in H ₂ O, autoklaviert
LB-Platten:	32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco) in H ₂ O, autoklaviert

Brucella-Medium:	28 g/l Brucella- <i>broth</i> (Becton Dickinson) in H ₂ O, autoklaviert
Serum-Platten:	36 g/l GC-Agar-Base (Oxoid), nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix; 80 ml/l Pferdeserum (PAA); 10 mg/l Vancomycin; 5 mg/l Trimethoprim; 1 mg/l Nystatin
Vitamin-Mix:	100 g/l α -D-Glucose; 26 g/l L-Cystein; 10 g/l L-Glutamin; 1,1 g/l L-Cystin; 1 g/l Adenin; 0,5 g/l Uracil; 0,25 g/l NAD ⁺ ; 0,15 g/l L-Arginin; 0,1 g/l Cocarboxylase; 0,03 g/l Guanin; 0,02 g/l Fe(III)-Nitrat; 0,013 g/l p-Aminobenzoesäure; 0,01 g/l Vitamin B ₁₂ ; 0,003 g/l Thiamin
RPMI-Medium:	RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco BRL)
Einfriermedium:	Brucella broth mit 10 % FCS; 20 % Glycerin

2.1.9 Antibiotika und Zusätze

Ampicillin (Amp)	100 mg/l (LB-Medium/-Platte)
Bacitricin	100 mg/l (DENT-Platten)
DENT-Mix:	10 mg/l Vancomycin; 5 mg/l Amphotericin B; 5 mg/l Cefsulodin; 5 mg/l Trimethoprim (DENT-Platte)
Erythromycin (Erm)	250 mg/l (LB-Medium/-Platte) 10 mg/l (Serumplatte)
Kanamycin (Kan)	50 mg/l (LB-Medium/-Platte)
Nystatin	1 mg/l (Serumplatte)
Nalidixinsäure	10 mg/l (DENT-Platten)
Polymyxin B	1 U/l (DENT-Platten)
Streptomycin (Str)	250 mg/l (LB-Medium/-Platte) 250 mg/l (Serumplatte)
Trimethoprim (Tmp)	5 mg/l (Serumplatte)
Vancomycin	10 mg/l (Serumplatte)
X-Gal	40 mg/l (LB-Medium/-Platte)

2.1.10 Puffer und Lösungen

Puffer für die Zellkultur

PBS:	0,2 g/l KCl; 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ ; 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄
PBS*:	PBS mit Inhibitor-Mix
Inhibitor-Mix:	(hemmt Proteasen und Phosphatasen): 1 mM Na-Orthovanadat;

1 mM PMSF; 1 μ M Leupeptin; 1 μ M Pepstatin
Trypsin-EDTA-Lösung: PBS; 5 mM Glucose; 50 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Trypsin;
pH 7,2

Puffer für die Aufreinigung plasmidischer DNA

STET-Puffer 8 % Saccharose; 5 % Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM
Tris-HCl; pH 8,0

Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

GEBS-Puffer: 50 mM EDTA; 20 % (v/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) N-
Laurylsarkosin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
TAE-Puffer : 40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5
Ethidiumbromidfärbepuffer: 1 mg/l Ethidiumbromid in Wasser

Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen); catalog number 28704

Puffer für die Zentrifugationsentsalzung

Sephadex G-50 Lösung: 47 g/l Sephadex G-50, 0,05 % Na-Azid

Puffer für Elektroporation

Elektroporationspuffer: 2,43 mM K_2HPO_4 ; 0,57 mM KH_2PO_4 ; 272 mM Saccharose;
15 % Glycerin)

Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Probenpuffer (2x): 50 mM Tris-HCl; 100 mM DTT; 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v)
Glycerin; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,1 % (w/v)
Bromphenolblau; pH 6,8
Acrylamidlösung: 29 % (w/v) Acrylamid; 1 % (w/v) N,N'-Methylenbisacryl-amid
Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
Sammelgelpuffer: 1,0 M Tris-HCl; pH 6,8
Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-HCl; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3

Puffer und Lösungen für Western Blot

Western-Transferpuffer:	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3
TBS:	200 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5
Detektionslösung:	0,1 M Tris-HCl; 7 mM MgCl ₂ ; 0,1 g/l NBT; 50 mg/l BCIP; pH 9,6
Waschpuffer:	TBS; 0,5 % (v/v) Tween20; pH 7,4
Absättigungspuffer:	TBS; 3 % (w/v) BSA; 0,1 % (v/v) Tween20; pH 7,4
Stripping-Puffer:	100 mM NaOH; 2 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) DTT

Puffer und Lösungen für IL-8 ELISA

Beschichtungspuffer:	100 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 9,0
Waschpuffer:	PBS; 0,05 % (v/v) Tween20
Absättigungspuffer 1:	PBS + 10 % FCS (inaktiv)
Absättigungspuffer 2:	PBS + 0,05 % Tween20 + 10 % FCS (inaktiv)
Konjugatlösung:	50 mM Tris-HCl; Streptavidin-Biotin-POX-Konjugat (1:5000); pH 7,6
Substratlösung:	TMB (Tetramethylbenzidin) Substrate Reagent Set, BD Pharmingen

2.1.11 Chemikalien

Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30 %) (Roth); Agarose (Sigma); 5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP) (Roth); Bromphenolblau (Serva); Brucella-Broth (Becton Dickinson); Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-)Mix (TaKaRa); EDTA; Ethidiumbromid (Sigma); Formalin; GC-Agar (Oxoid); Lennox-L-Agar (Gibco); Lennox-L-Broth (Gibco); Leupeptin; N, N, N', N'-Tetramethyldiamid (TEMED) (Sigma); Natrium-Orthovanadat; Nitrotetrazoliumblauchlorid (NBT) (Roth); PBS Dulbecco's (Gibco BRL); Pepstatin; RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (Gibco BRL); SDS; TritonX-100; Tween20; X-Gal (Sigma)

2.1.12 Geräte und Apparaturen

Agarosegelkammern (BioRad); Autoklav (Sterimaquet, Maquet); Automatikpipette (Brand); Brutschränke (Heraeus, Scholzen, WTC Binder,); ELISA-Reader (Tecan); Elektrobloßapparat (Biotec Fischer); Gefriertruhe (-70 °C) (Heraeus); Gefriertruhe (-20 °C)

(Liebherr); Heizblöcke (Techne); Homogenisatoren (Reiss Laborbedarf); Kühlschrank (Liebherr); Laborbrenner (Usbeck); Laborabzug (Waldner); Lichtmikroskop (Olympus); Magnetrührer (Heidolph, IKA Labortechnik); Mikrowelle (Siemens); Minizentrifuge (neoLab); PAGE-Mini-Gelapparaturen (BioRad); PCR-Gerät (Peqlab, Biometra); pH-Meter (WTW); Photometer (Biochrom); Pipetten (Gilson, Brand); Rollmischer (Assistent); Schüttelinkubatoren (GFL); Spannungsquellen (Biotec Fischer, Amersham Pharmacia Biotech); SpeedVac (Savant); Spectrophotometer NanoDrop (Peqlab); Sterile Werkbank (BDK); Thermomixer (Eppendorf); UV-Transluminator (Bachofer); Video-Geldokumentationsanlage (Biorad); Vortex (Heidolph); Waagen (Sartorius); Wasserbäder (GFL); Zentrifugen (Eppendorf)

2.1.13 Verbrauchsmittel

Einfrierröhrchen (Nalgene); PVDF-Membran (BioRad); Röntgenfilm und Expositionskassetten (Fuji und Kodak); Zellschaber (Falcon); Zellkulturflaschen/-schalen (Nunc); Filterpapiere (Whatman); Well-Platten (Nunc, TPP)

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Tieren

2.2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Die Mongolischen Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) werden spezifisch pathogenfrei (SPF) und nach dem Hygienemanagement nach FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) im Haus gehalten. Die Tiere unterlagen einem 12 h-Licht/Dunkelheit-Zyklus bei einer RT von 21 – 22 °C. Sie stammen aus der eigenen Zucht des Max von Pettenkofer-Instituts und Zukäufen der Firma Janvier (Le Genest Saint-Isle, Frankreich). Das Betreten des Raumes ist nur in Schutzkleidung gestattet, für die Versuche wurden nur autoklavierte und sterile Instrumente und Materialien verwendet. Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.1.2 Infektionsversuche

Die Infektionen wurden oral durchgeführt. Dies erfolgte ohne Narkose mit Knopfkanülen, die eine schmerzlose, direkte Applikation in den Magen ermöglichen (Abb. 2.1). Eine Bakteriensuspension mit $OD_{550} = 3,3$ in einem Volumen von 400 µl (BB-Medium) wurde

verabreicht (Entspricht ca. 1×10^9 Bakterien). Nach 2-32 Wochen wurden die Tiere durch CO₂ getötet. Eine erfolgte Kolonisierung des Magens durch *H. pylori* wurde durch eine quantitative Reisolierung der Bakterien aus dem Magen und Kultivierung auf spezifischen Nährböden nachgewiesen. Dafür wurde der Gerbil-Magen, in Antrum und Korpus getrennt, gewogen, in Gewebehomogenisatoren homogenisiert und in Verdünnungen auf Selektivmedien ausplattiert. Nach Inkubation für 3-5 Tage bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen konnte mit Hilfe des Magengewichts und der gewachsenen Kolonien die *colony forming units* pro Gramm Gewebe errechnet werden.

Die Tierversuchsantragsnummer lautet AZ-55.2-1-54-2532-1-11.

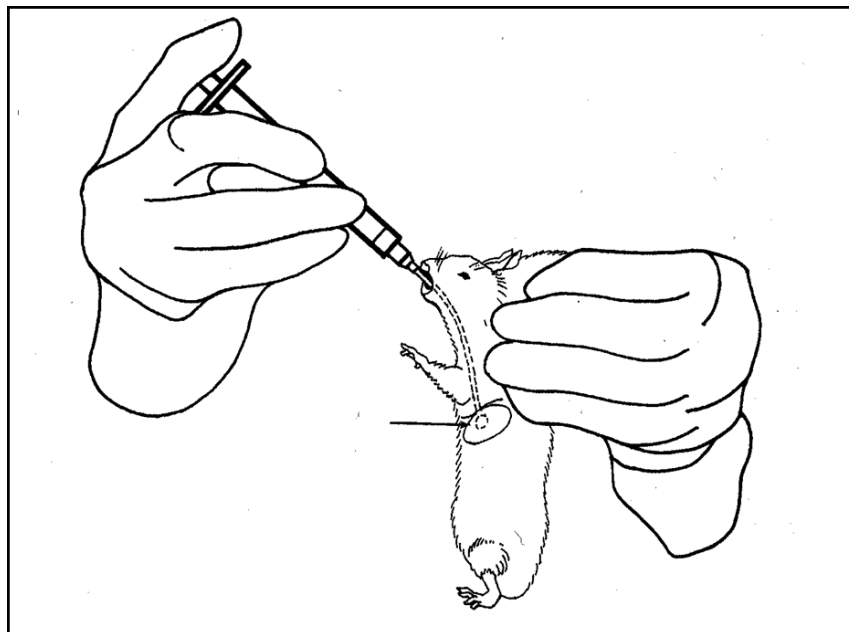


Abb. 2.1: Schematische Darstellung einer Infektion von *M. unguiculatus*

Der Gerbil wird an der Nackenfalte fixiert. Die gebogene Knopfkanüle gleitet passiv über die Schluckbewegungen in den Ösophagus. Sie wird bis in den Magen vorgeschoben bevor die Bakteriensuspension appliziert wird.

Abbildung aus: The Laboratory HAMSTER & GERBIL; Karl J. Field, Amber L. Sibold [54]

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von *Escherichia coli* Stämmen erfolgte auf Luria-Bertani- (LB-) Platten oder in LB-Flüssigmedien, welchen gegebenenfalls Antibiotika in geeigneter Konzentration zur Selektion zugegeben wurden. Inkubiert wurde je nach gewünschter

Wachstumsgeschwindigkeit bei RT oder bei 37 °C im Brutschrank bzw. Schüttelinkubator (bei 140 rpm). Zur kurzfristigen Aufbewahrung der Kulturen wurden die Agar-Platten mit Parafilm (Pechiney Plastic Packag, Chicago) abgedichtet und bei 4 °C gelagert und somit eine Vermehrung verhindert. Für die Stammhaltung wurden die Bakterien einer halben, gut bewachsenen Platte in 1 ml LB-Flüssigmedium mit 20 % Glycerin resuspendiert und bei -70 °C eingefroren.

H. pylori wurde auf Serum-Platten, oder durch Antibiotika Zugabe auf Serum-Selektivplatten, kultiviert. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C in Anaerobentöpfen oder im Brutschrank unter mikroaerophilen Bedingungen (Begasung mit 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) für ein bis zwei Tage. Dauerkulturen wurden angelegt indem eine dicht bewachsenen Platte in 1 ml Brucella-Medium mit 20 % Glycerin und 10 % FCS resuspendiert und bei -70 °C gelagert wurden. Nach dem Auftauen aus der Gefrierkultur wurden die Bakterien zunächst für drei Tage bei 37 °C, mikroaerophil bebrütet und anschließend auf neue Platten überimpft bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

2.2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte von Flüssigkulturen

Die Bakterien wurden mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte genommen und im gewünschten Medium resuspendiert. In einer 1:10 Verdünnung in einer Plastikkuvette mit Schichtdicke $d = 1$ cm wurde die optische Dichte gegen den jeweiligen Blindwert gemessen. Das dabei verwendete Spektralphotometer wurde auf eine Wellenlänge von $\lambda = 550$ nm (OD₅₅₀) eingestellt.

2.2.2.3 Chemische Transformation von *E. coli* DH5 α

Bei der chemischen Transformation wurde pro Ansatz eines der bei -70 °C gelagerten Aliquots kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Je nach Konzentration der DNA wurden 3 – 5 μ l eines Ligationsansatzes bzw. 1 – 2 μ l Plasmid-DNA vorsichtig zugegeben. Nach der Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen für 90 s in einem auf 42 °C vorgeheiztem Thermoblock einem Hitzeschock unterzogen und anschließend erneut für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml LB Medium wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde der Ansatz auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Chemische Transformation von *E. coli* Top10

Bei schwierigen Klonierungen wurde für eine bessere Transformationseffizienz kommerziell erworbene, hochkompetente *E. coli* Top10 (Invitrogen) verwendet. Dabei erfolgte die Transformation nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.5 Transformation von *H. pylori*

H. pylori ist natürlich kompetent für die Aufnahme von DNA. Für die Transformation wurden die Bakterien ohne Vorbehandlung in sterilem Brucella-Flüssigmedium, welches mit 10 % FCS versetzt wurde, resuspendiert und auf eine OD₅₅₀ von 0,2 eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde mit 1 µg DNA versetzt und ca. 4 h bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde auf entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert und unter mikroaeroben Bedingungen 3-5 Tage inkubiert.

2.2.2.6 Elektroporation von *H. pylori*

Mit einem sterilen Wattetupfer werden die Bakterien von der Platte einer Übernachtskultur abgenommen in 1 ml PBS resuspendiert und auf eine OD 550 von 1 in 500 µl PBS eingestellt. Anschließend wird das nach Zentrifugation entstandene Pellet zwei- bis dreimal mit kühlem Elektroporationspuffer gewaschen, schließlich in 55 µl Elektroporationspuffer gelöst und, mit 100 bis 500 ng der zu transfizierenden DNA versetzt, auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgte in einer Gene PulserTM Apparatur bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Unmittelbar nach der Pulsgabe wurde je Ansatz 1ml BB + 10%FCS hinzugegeben und in eine Well-Platte überführt, welche für 4h bei 10 % CO₂ und 37 °C inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension bei 4000 rpm 5min zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in ~100 µl des Überstands resuspendiert und auf die jeweilige Selektivplatte ausplattiert. Die Platten wurden für 5-7 Tage unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert.

2.2.2.7 Herstellung bakterieller Zellysate (Lämmli, 1970) [60]

Zur Herstellung eines Zellysates für die SDS-PAGE wird eine Impföse Bakterien von der Agarplatte geerntet und in 50 µl sterilem Wasser suspendiert, mit 150 µl 2xSDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol versetzt und für 10 min auf 96 °C erhitzt. Danach wird die Probe für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Zell-Lysat bei -20 °C gelagert oder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt.

2.2.3 Arbeiten mit Zellkulturen

2.2.3.1 Kultivierung von AGS-Zellen

Die Kultivierung der humanen Magenkarzinomzelllinie AGS erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen in RPMI-Medium (supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Glutamin) bei

37 °C und 5 % CO₂ .

Von einer konfluent gewachsenen Kultur wurde das Medium abgesaugt und die adhärenente Zellschicht einmal mit 5 ml PBS-Dulbecco's gewaschen, um Mediumreste und abgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für etwa 5 min mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (1x) überschichtet und bei 37 °C und 5 % inkubiert, was das Ablösen der Zellen von der Unterlage bewirkt. Sobald alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst waren (leicht klopfen, dann mikroskopische Kontrolle), wurde die Protease durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium inaktiviert und 2 ml der Zellsuspension zu 12 ml frischem Kulturmedium in eine neue Zellkulturflasche gegeben (1:4). Bei einer Verdopplungszeit der AGS-Zellen von 24 h wurde dieser Vorgang jeden zweiten Tag wiederholt. Für Infektionsexperimente wurden die AGS-Zellen je nach Bedarf in 6-Napf-Zellkulturschalen (10 cm² Grundfläche und 2 ml Medium pro Napf), 24-Napf-Zellkulturschalen (2 cm² Grundfläche und 1 ml Medium pro Napf) oder 75 cm²-Zellkulturflaschen (12 ml Medium) gesplittet. Zellsuspension und Zellkulturmedium wurden entsprechend der verwendeten Zellkulturschalen gemischt, in die Näpfe pipettiert und dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (24 h).

2.2.3.2 Infektionen mit *H. pylori* für Phosphotyrosin-Experimente und IL8-ELISA

Für Infektionen wurde das verbrauchte Zellmedium durch frisches ersetzt und die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von einer Plattenkultur abgetragen und in RPMI-Medium mit 10 % FCS resuspendiert.

Die AGS-Zellen wurden in 12well-Zellkulturschalen zu einer Konfluenz von 70 % angezüchtet und mit der *H. pylori*-Suspension so infiziert, dass im Napf (bei 1 ml Medium) eine OD₅₅₀ von 0,2 vorlag. Das entspricht in etwa einer MOI (*multiplicity of infection*) von 50. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 4 h wurden die Zellen auf Eis gelagert. Als Proben für *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) wurde der Überstand in 1,5 ml Eppendorf Gefäße pipettiert und bei -20 °C gelagert.

Jeder Napf wurde nun dreimal mit 2 ml gekühltem PBS-Puffer gewaschen, bevor die Zellen in 500 µl PBS*-Puffer mit einem Zellschaber gelöst und im 1,5 ml Eppendorf Gefäß für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C ab zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 30 µl PBS*-Puffer resuspendiert, mit 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 96 °C erhitzt.

2.2.4 Arbeiten mit DNA

2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes and Quigley, 1981

Die von Holmes und Quigley 1981 beschriebene Methode wurde zur Isolierung von Plasmiden für analytische Zwecke durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass chromosomale DNA, Proteine und Zellwandbestandteile nach Erhitzen (95 °C) in einer Syndet-haltigen Lösung ausfallen und durch Zentrifugation von RNA und Plasmid-DNA, die gelöst im Überstand zu finden sind, getrennt werden können.

Der Bakterienrasen wurde in STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym und nach einem Hitzeschock wurden die denaturierten Proteine entnommen. Mit Isopropanol wurde die DNA aus dem Überstand gefällt, abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 30-50 µl steril-destilliertem H₂O aufgenommen.

Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit dem „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen)

Das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden) wurde eingesetzt, um Plasmide in größerer Menge und Reinheit zu isolieren sowie sie dann für präparative Zwecke, wie etwa für Sequenzierungen, zu verwenden. Das Verfahren basiert auf einer alkalischen Lyse und anschließender chromatographischer Reinigung der Plasmide über eine Anionen-Austauscher-Säule. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung, alle präparierten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori*

Wie auch bei der Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

2.2.4.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. pylori*

Hierfür wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben verwendet.

2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion [56, 75] dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* im Rahmen von Klonierungsarbeiten, zur Charakterisierung verschiedener *H. pylori* Stämme und zur Analyse von Mutanten.

Als Matrize wurde chromosomale DNA oder Plasmid-DNA eingesetzt. Je nach Anwendung

wurden die PCR-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 25 µl, 50 µl oder 100 µl durchgeführt. Der 25 µl Ansatz enthielt 3 µl Template-DNA, je 1 µl Oligonukleotid (2 µM), 2 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM), 2 U *Taq-/Pfu*-Polymerase, 2 µl MgCl₂ (25 mM) sowie 2,5 µl des mitgelieferten Polymerase-Puffer (10x). Die Differenz zum Endvolumen wurde mit Reinstwasser aufgefüllt. Abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes wurde die Dauer der Elongation angepasst (1000 bp pro 1 min).

Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 5 min wurde in der Regel der folgende Reaktionszyklus 35-fach wiederholt: Denaturierung der DNA für 30 sec bei 95 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide für 1 min bei 42-54 °C und Polymerisation je nach Matrizenlänge bei 72 °C.

2.2.4.5 *Overlap*-PCR

Mittels *overlap*-PCR können Punktmutationen gesetzt werden, beispielsweise um Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen zu entfernen. Dazu wurden zwei Primer synthetisiert, welche die gewünschte Punktmutation enthielten, sich in einem Bereich von mind. 20bp überlappten und gegenläufige Orientierung besaßen. Dann wurden zwei voneinander unabhängige, normale PCRs durchgeführt mit jeweils einem der Primer, der die Mutation enthielt, und einem entgegengesetzten, das gewünschte DNA-Fragment flankierenden Primer. Die entstehenden Fragmente wurden in einer nächsten PCR als Primer und Template eingesetzt und für 10 Zyklen eine PCR mit verlängerter Annealingzeit von 1min durchgeführt. Dann wurden Primer, welche das gewünschte ganze Fragment flankierten, zum Reaktionsansatz dazugegeben und noch einmal 20 Zyklen um die Menge des Endprodukts zu erhöhen.

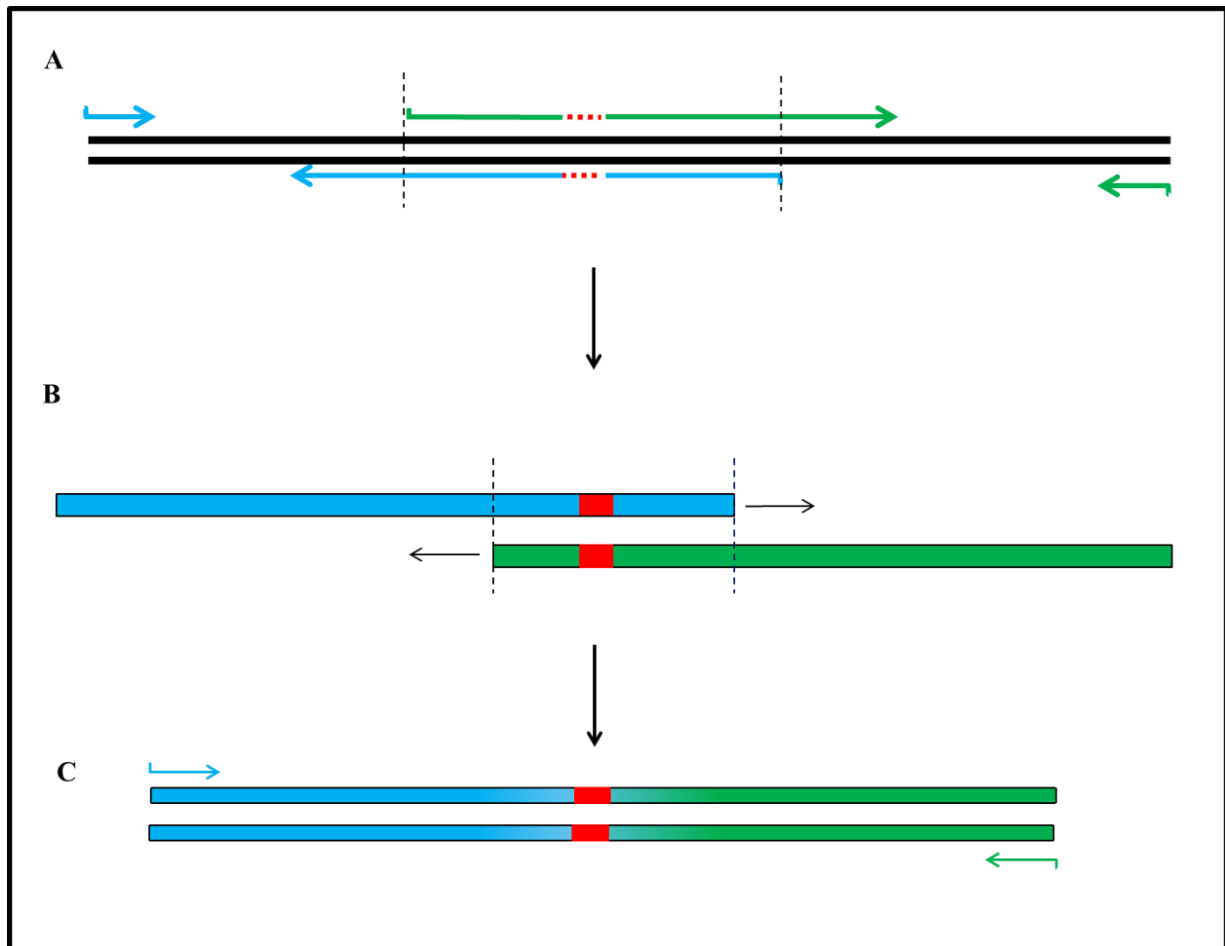


Abb. 2.2: Schematische Darstellung einer *overlap*-PCR

A) Durchführung von zwei PCRs mit Primern welche die gewünschte Punktmutation enthalten

B) Annealing und Amplifikation der beiden Produkte im *overlap*-PCR Ansatz ohne Primer

C) Zugabe der flankierenden Primer und Vervielfachung des Amplifikates

2.2.4.6 *randomly amplified polymorphic DNA* – PCR nach Williams *et al.* [115]

Bei der *randomly amplified polymorphic DNA* (kurz: RAPD) – PCR werden ein zufällig konzipiertes kurzes Oligonukleotid mit der DNA verschiedener Bakterienklone inkubiert. Der Primer bindet bei jedem Klon an unterschiedlichen Stellen im Genom und amplifizieren unterschiedlich lange Sequenzen. Damit entsteht in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte ein für jeden Stamm spezifisches Bandenmuster. Dadurch kann in Kolonisierungsversuchen im Tiermodell mit mehreren Klonen infiziert werden und die Reisolatate per RAPD-PCR wieder den Stämmen zugeordnet werden.

Die RAPD-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 94 °C (5 min), 40 °C (5 min), 72 °C (5 min): für 5 Zyklen
- 94 °C (1 min), 55 °C (1 min), 72 °C (1 min): für 30 Zyklen
- 72 °C für 10 min

2.2.4.7 DNA-Gelelektrophorese

Die analytische Gelelektrophorese erfolgte im Horizontalgel mit einer Agarosekonzentration von 0,8-2,0 % (w/v). Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit ¼ Volumen GEBS versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V für ca. 45 min mit 1xTAE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel 10-15 min lang in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l) gefärbt und die DNA-Banden durch UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht. Ein mitgeführter DNA-Längen-Standard ermöglichte die Abschätzung der Fragmentgrößen. Für die Dokumentation wurde ein Videosystem der Firma Biorad (Molecular Imager Gel Doc XR System) verwendet.

2.2.4.8 DNA-Fragmentisolierung

Um DNA-Fragmente nach einer präparativen Gelelektrophorese aus dem Agarosegel herauszulösen, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanweisung.

2.2.4.9 Restriktion von dsDNA

Die Restriktion von DNA wurde für analytische Zwecke in einem Volumen von 10 µl und für präparative Restriktionen in einem Volumen von 50 - 100 µl durchgeführt. Puffer- und Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers (Roche). Es wurden 0,1-1 µg DNA eingesetzt, die Enzymmenge betrug 1 - 2 U/µg DNA. Die Inkubation erfolgte für 1,5-4 h bei 37 °C in einem Heizblock oder Brutschrank. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von ¼ Volumen GEBS-Puffer gestoppt.

2.2.4.10 Dephosphorylierung linearer DNA

Zur Erhöhung der Ligationseffizienz von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektor-DNA wurden die 5'-Enden des Vektors mit SAP dephosphoryliert. Für die Reaktion wurden je 10 µl Ansatz 1 U/ µg SAP (Roche) zugegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 1 h bei 65 °C abgestoppt. Der Ansatz wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) oder per Zentrifugationsentsalzung gereinigt.

2.2.4.11 Zentrifugationsentsalzung

Zur Abtrennung von Salzen, Nukleotiden, kurzen DNA-Fragmenten und denaturierten Proteinen von für die Klonierung benötigter DNA wurde die Zentrifugationsentsalzung als ausschlusschromatographisches Verfahren eingesetzt. Dabei wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit einer glühenden 20 G (Gauge) Nadel an dessen Boden eingestochen, mit

20 µl silikonisierten Glaskugeln wieder abgedichtet und mit dem Säulenmaterial Sephadex G-50 (in wässriger Lösung) aufgefüllt. Die Säule wurde zum Auffangen des Durchflusses in ein weiteres Eppendorf Gefäß gestellt, durch Zentrifugation (3700 rpm, 2 min) äquilibriert und vor dem Auftragen der Probe einmal mit 100 µl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Die zu entsalzende Probe wurde mit ¼ Volumen GEBS gemischt, auf die Säule aufgetragen und nach erneuter Zentrifugation (3700 rpm, 2 min) in einem frischen Eppendorfgefäß aufgefangen.

2.2.4.12 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. In der Regel wurde ein Verhältnis von 3:1 (Insert : Vektor) gewählt. Dem Ansatz wurden 1 U T4-DNA-Ligase (Roche) und 1 µl 10fach-Ligationspuffer (Roche) zugegeben und bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht oder bei 16 °C für 4 h inkubiert.

2.2.4.13 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning™ (Invitrogen)

Das TOPO-TA-Cloning™-Kit von Invitrogen wurde nach Angaben des Herstellers für die Klonierung von PCR-Produkten mit Überhang-Desoxyadenosin verwendet.

2.2.4.14 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Die eingesetzte Plasmid-DNA (in einer Konzentration von 30-100 ng/µl) wurde über Qiagen Säulen isoliert und gereinigt, PCR-Produkte (10-50 ng/µl) über das Qiagen Gel Extraction Kit aufbereitet. Zur Sequenzierung wurden entweder von der Firma angebotene Standardoligomere oder für die entsprechende DNA-Sequenz spezifische Oligonukleotide gewählt. Zur Auswertung der Sequenzen wurde das Programm DNAMAN (Lynnon Software) verwendet.

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem Mini-ProteinIII™ der Firma BioRad benutzt. Trenn- und Sammelgele wurden nach Sambrook, 1989 angesetzt. Zuerst wurde bis ca. 3 cm unterhalb des Randes der Glaskammer ein 8 % Trenngel gegossen und mit 96 % Ethanol beschichtet, um beim Aushärten des Gels eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation wird das Ethanol abgezogen und das vorher vorbereitete Sammelgel (5 %) aufgegossen, ein Kamm zur Taschenbildung eingesetzt

und das Gelsandwich mit etwas Agarose gegen Austrocknen abgedichtet. Nach dem Einsetzen der Gele in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer wurden 10 µl der aufbereiteten und mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteinproben mit einer Hamiltonspritze in die Geltaschen des Sammelgels gefüllt. Eine für 10 min angelegte Vorlaufspannung von 80 V garantierte das bessere Einlaufen und Konzentrieren der Proteine an der Gelgrenzfläche der Gele. Anschließend wurde für den Hauptlauf eine Spannung von 110-120 V für ca. 90 min angelegt.

	Trenngel (für 5 ml) [ml]				Sammelgel (für 1 ml) [ml]
	6 %	8 %	10 %	12 %	5 %
Acrylamid/Bis (30%)	1,0	1,3	1,7	2,0	0,17
1,5 M Tris (pH8,8)	1,3	1,3	1,3	1,3	-
1,0 M Tris (pH6,8)	-	-	-	-	0,13
H ₂ O	2,6	2,3	1,9	1,6	0,68
SDS (10 %)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
APS (10 %)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
TEMED	0,004	0,003	0,002	0,002	0,001

2.2.5.2 Western Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennte Proteine anfärben zu können werden sie auf eine Trägermembran übertragen [87]. Die Übertragung der durch SDS-PAGE im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgte in einem *semi-dry* Blotsystem durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld [111].

Allgemeine Western Blot-Untersuchung

Dabei wurden jeweils 2, in Western-Transfer-Puffer getränkte, dicke und dünne Filterpapiere in der Größe des zu blottenden Gels luftblasenfrei auf die Graphitanode gestapelt. Darauf wurde eine, für 5 min in Methanol aktivierte und in Western-Transfer-Puffer ausgeschwenkte, PVDF-Membran zusammen mit dem SDS-Gel gelegt, von wiederum 4 Filterpapieren luftblasenfrei bedeckt und die Graphitkathode aufgesetzt. Der Proteintransfer erfolgte bei 1 mA/cm² für 1,5 h. Nach dem Blotten wurde die Membran überlappungsfrei in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 5 ml Absättigungspuffer für 1 h auf einem Rollschüttler inkubiert. Danach wurde das jeweilige Antiserum zugegeben und die Membran wurde weiter für mindestens 2 h, meist jedoch über Nacht inkubiert. Überschüssiger

Antikörper wurde durch mindestens 4-maliges Waschen mit Waschpuffer für 5 min entfernt, bevor der sekundäre Antikörper (POX-gekoppelt) bzw. Protein A (AP-gekoppelt) in 5 ml TBS mit 0,5 % Tween geeignet verdünnt zugegeben wurde. Nach 1 h Inkubation wurde erneut wie oben beschrieben gewaschen.

Entwicklung mit AP-Konjugaten

Für die Detektion wurde die Membran in 10 ml frisch angesetzter Detektionslösung geschwenkt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Dann wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit H_2O gestoppt.

Entwicklung mit POX-Konjugaten

Die Verwendung von POX-Konjugaten ist eine sensitivere Methode der Bandendetektion im Vergleich zu AP-Konjugaten. Es wurden hierfür ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrat für Western Blot (Millipore) verwendet.

Dazu wurden je 1 ml der beiden Detektionslösungen in das 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, 2 min auf dem Rollschüttler inkubiert und die Membran anschließend luftblasenfrei fixiert. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz, die von der Membran in einer Expositionskassette auf einen Röntgenfilm übertragen werden konnte.

Phosphotyrosin-Experimente

Um tyrosinphosphorylierte Proteine auf der PVDF-Membran nachzuweisen wurde der Phosphotyrosin-Antikörper PY99 verwendet, an welchem als sekundären Antikörper α -Maus-IgG-POX band.

Der Aufbau der Blotting-Apparaturen und die Durchführung des Proteintransfers erfolgten wie beim allgemeinen Western Blot (siehe oben).

Auch sämtliche Puffer sind mit denen des oben beschriebenen Verfahrens identisch, lediglich die Waschschrte verdoppelten sich auf je 8 mal 5 min mit 5 ml TBS + 0,5 % Tween.

Als Proben dienten die in 2.2.3.2 gewonnenen Lysate infizierter AGS-Zellen.

Die Detektion erfolgte mittels ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrat für Western Blot (Millipore). Belichtet wurde je nach Probenmenge zwischen 5 s und 3 min.

Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen

Nach der Entfernung von Reaktionslösung sowie von Primär- und Sekundärantikörpern auf Western Blot Membranen kann die Membran einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen werden.

Nach Inkubation mit Entfernungspuffer für 1 h bei 55 °C wird die Membran mit Waschpuffer gewaschen und kann dann erneut für eine Detektion verwendet werden.

2.2.6 IL-8 ELISA

Diese Methodik geht zurück auf Engvall *et al.* [32]. Bei dem hier angewandten Verfahren handelt es sich um eine Sandwich-ELISA, bei der beide Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Die zu untersuchenden Proben stammen aus den in 2.2.3.2 beschriebenen Zellinfektionsversuchen.

Der primäre Antikörper, ein monoklonaler AK gegen humanes IL-8, wurde auf eine 96-Napf-Platte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C gelagert (*coating*). Die Platte wurde am nächsten Tag 4 mal mit 200 µl Waschpuffer pro Napf gewaschen, mit je 200 µl Absättigungspuffer 1 für 2-4 h bei RT inkubiert und daraufhin 3 mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Standardproben wurden aus einem Aliquot mit 1600 pg/ml durch eine Verdünnungsreihe auf je die Hälfte der Konzentration, inklusive eines Null-Wertes, hergestellt. Standard- und Versuchsproben wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen wurde ein biotinylierter anti IL-8 AK aufgetragen und für 1-2 h bei RT inkubiert und die ungebundenen Reste abgewaschen, bevor mit 100 µl Konjugatlösung für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Darauf wurde schließlich die Substratlösung pipettiert (100 µl) und 5-30 min bei RT im Dunklen gelagert. Mit je 50 µl H₂SO₄ pro Napf wurde die Reaktion bei gewünschter Farbintensität gestoppt. Das Auslesen erfolgte per ELISA-Reader bei einer Extinktion von 450 nm (Referenzwellenlänge 570 nm) und wurde mittels der Software „Magellan“ dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Gerichtete Mutagenese von chromosomalem *cagA*

Genetisch veränderte Bakterien können gezielt auf eine Mutation selektiert werden, indem man am Ort der Mutation einen Selektionsmarker in Form einer Antibiotikaresistenz einbringt. Dadurch können Gene, die stromabwärts des Markers liegen in ihrer Translation und Expression beeinflusst werden.

Mit der Kontraselektionsmethode werden Gene oder Abschnitte des Chromosoms ohne Selektionsmarker mutiert [26].

Die Zwei-Gen-Kassette, die im Rahmen dieser Kontraselektionsstrategie angewandt wurde ist in Abb. 3.1 dargestellt. Der Wildtyp der hierfür verwendeten *H. pylori* Stämme ist gegenüber Streptomycin resistent (Str^R) und Erythromycin sensibel (Erm^S). Durch das Einbringen der Genkassette wird die Mutante Str^S und Erm^R . Die Klone zeichnen sich daher durch Wachstum auf Nährböden mit Erythromycin-Antibiose, bei gleichzeitiger Unfähigkeit auf Streptomycin-Platten zu wachsen, aus. Erklären lässt sich das durch die dominante Funktion des *rpsL*-Wildtyp-Gens aus *Campylobacter jejuni* (*rpsL_{Cj}*) in Streptomycin-resistenten Stämmen. Wird die Resistenzkassette aus dem Genom deletiert oder gegen ein anderes Stück DNA ausgetauscht, fehlt dem Bakterium die, durch das *rpsL_{Cj}*-Gen vermittelte, Dominanz der Streptomycin-Sensitivität. Die mutierten Bakterien lassen sich nun auf Streptomycin selektionieren.

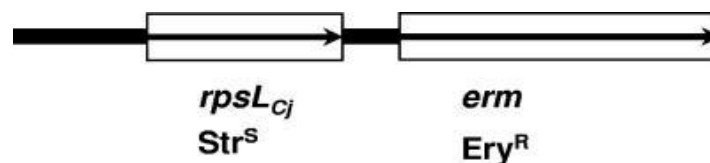


Abb. 3.1: Die Zwei-Gen-Kassette *rpsL-erm*.

Die 1,5 kb große *rpsL-erm*-Kassette besteht aus dem Gen *rpsL_{Cj}* aus *C. jejuni* und dem Gen *erm*. Sie vermittelt im Streptomycin-resistenten Hintergrund Streptomycin-Sensitivität und Erythromycin-Resistenz.

3.1.1 Platzierung der *rpsL-erm*-Kassette in der EPIYA-Region von *cagA*

Das Ziel dieser Arbeit war die Klonierung von *H. pylori* B8 Mutanten mit veränderten N-terminalen CagA-Regionen. Mutanten mit unterschiedlicher Anzahl an Phosphorylierungsmotiven sollten generiert werden und in Zellversuchen und im Tiermodell auf den Schweregrad der durch sie induzierten pathologischen Veränderungen untersucht werden. Der Wildtyp von B8 codiert ein CagA mit drei EPIYA Motiven. Im 3555 bp langem *cagA* wurde ab der Base 2095 ein 876 bp großes Stück deletiert und gegen die 1534 bp lange *rpsL-erm*-Kassette ersetzt. Auf einem pBluescript II SK+ Vektor (Stratagene) wurde die *rpsL-erm*-Kassette mit homologen Bereichen von *H. pylori* B8 eingerahmt. Die flankierenden Sequenzbereiche der *rpsL-erm*-Kassette entsprechen den jeweiligen flankierenden Sequenzbereichen des im Stamm B8 zu ersetzenden Genabschnittes. Das entstandene Plasmid pGR15 (Abb. 3.2) wurde in B8 transformiert und durch homologe Rekombination die EPIYA-Region gegen die Resistenzkassette ersetzt. Durch Testung der Wachstumsfähigkeiten auf Erythromycin- und Streptomycin-Serumplatten, wurde auf erfolgreiche Transformation selektioniert. Das genetisch veränderte Bakterium wurde als Stamm B8-15 bezeichnet.

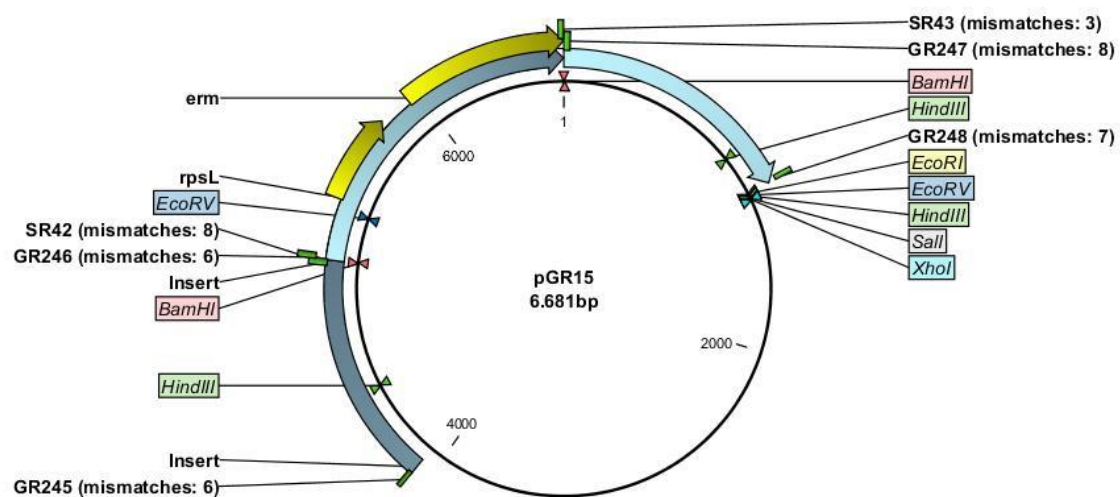


Abb. 3.2: Das Plasmid pGR15

Das Insert auf dem pBluescript Vektor besteht aus der Doppelresistenzkassette *rpsL-erm* die von B8-homologen Sequenzen flankiert wird

3.1.2 Konstruktion der *cagA* 3' repeat regions mit unterschiedlicher Anzahl an EPIYA Motiven

Zur Untersuchung des N-terminalen Bereiches von CagA wurden zwei *cagA* Mutanten mit unterschiedlicher Anzahl an EPIYA-Motiven kloniert. Das erste Konstrukt sollte fünf Phosphorylierungsstellen besitzen. Dafür wurde das Plasmid pRH-H274 als Template genutzt. Von diesem Plasmid, dessen Gerüst ein pHel3 Plasmid ist, wurde mit den Oligonukleotiden FG001 und FG002 die EPIYA-Region (Basenpaare 1767 – 3477) des sich auf dem Plasmid befindlichen *cagA* amplifiziert. Es handelte sich dabei um das Wildtyp-*cagA* des *H. pylori* Stammes NCTC11637.

Auf pRH-H275, ebenfalls ein pHel3 Plasmid, befindet sich eine *cagA* Variante von NCTC11637 in welcher Punktmutationen (Nukleobasentausch von Adenin zu Thymin) in den EPIYA Motiven zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin (Y) zu Phenylalanin (F) führten. Die Amplifikation mit den Oligonukleotiden FG001 und FG002 ergab ein PCR Produkt, dem die Tyrosine und somit die Phosphorylierungsstellen fehlen. Durch Ligation in einen TOPO-Vektor (Invitrogen) entstanden die Plasmide pFG1 (mit fünf EPIYA Motiven) und pFG2 (mit fünf EPIFA Motiven), deren Richtigkeit durch Sequenzierungen bestätigt wurde.

3.1.3 Transformation der Konstrukte pFG1 und pFG2

Die Plasmide pFG1 und pFG2, die für verschiedene CagA codieren, wurden in *H. pylori* B8-15 transformiert. Durch homologe Rekombination sollte die im 3' variablen Bereich des *cagA* Locus eingebaute *rpsL-erm*-Kassette gegen die konstruierten *cagA* 3' repeat regions ausgetauscht werden. Die *inserts* der Plasmide pFG1 und pFG2 wurden so entworfen, dass *upstream* und *downstream* der *rpsL-erm*-Kassette jeweils über 300 bp für die homologe Rekombination zur Verfügung stehen. Bei mehreren Transformationen wurden bis zu 54 Klone auf Erythromycin- und Streptomycin-Serumselektivplatten weiter gezüchtet. Klone die Erm^S und Str^R waren, wurden im Western Blot auf CagA Expression untersucht (Abb. 3.3). Bis zu 32 Klone einer Transformation wurden getestet. Es zeigten sich selbst bei dieser Anzahl an Klonen keine Banden und somit keine funktionelle CagA Proteinbiosynthese.

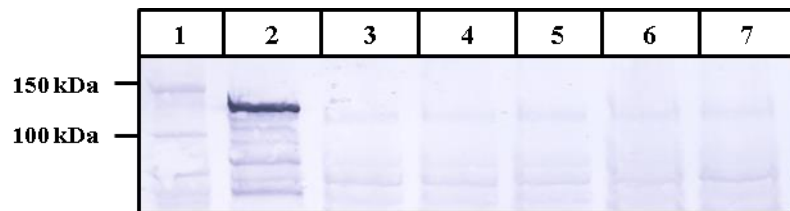


Abb. 3.3: Western Blot zur Detektion von CagA nach Transformation von pFG1 in B8-15

Dargestellt ist eine PVDF-Membran, die mit dem C-terminalen CagA-Antikörper AK268 inkubiert wurde und dieser über einen AP-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert wurde. Die Klone der Transformation von pFG1 in B8-15 zeigen keine CagA Expression (Spalten drei bis sieben).

1: Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2: B8 (positive Kontrolle); 3-7: B8-15 Klone nach Transformation mit pFG1

Im Genom der selektionierten Klone konnte mittels PCR kein *cagA* amplifiziert werden. Dabei wurden zuerst Primer mit Bindungsstellen, welche das zu transformierende Konstrukt flankieren zur Amplifikation genutzt. In einem zweiten Versuch mit einem Primerpaar, das an Start-Codon und Stop-Codon von *cagA* bindet, konnte ebenfalls kein PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abb. 3.4). In Anbetracht der Antibiotika-Resistenzen die die Klone zeigen wurde während der Transformation also die *rpsL-erm*-Kassette zusammen mit *cagA* oder einem unbekannt großen Teil der *cagPAI* aus der genomischen DNA eliminiert. Es kam nicht zu der erwünschten homologen Rekombination mit den Konstrukten auf den Plasmiden und somit nicht zum Einbau der veränderten 3' variablen Region von *cagA*.

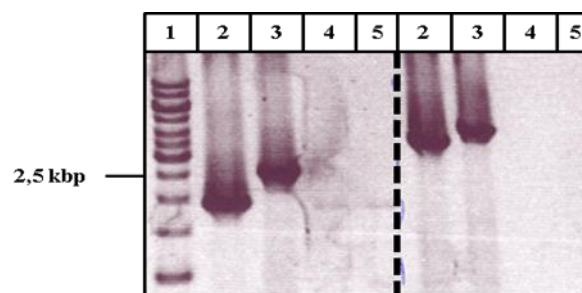


Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung der PCR-Amplifikation des *cagA* Genlokus nach Transformation von pFG1

Abgebildet ist die Originalaufnahme einer Gelelektrophorese im 1 % Agarosegel. Es zeigt die Produkte von zwei unterschiedlichen PCRs. Die Produkte auf der linken Seite des Bildes wurden mit den Oligonukleotiden, die direkt vor bzw. nach der EPIYA-Region binden (UB09/UB10), amplifiziert. Auf der rechten Seite der unterbrochenen Linie wurde mit den gleichen Proben als Matrizen eine PCR mit den Oligonukleotiden die an Start- bzw. Stopcodon von *cagA* inserieren (WS369/WS370) durchgeführt. In beiden Fällen ließen sich nur die beiden Positivkontrollen amplifizieren, nicht aber die Mutanten (hier exemplarisch nur zwei Klone aufgeführt).

1: 1 kbp DNA Ladder (Fermentas); 2: B8 wt; 3: B8-15; 4/5: B8-15 Klone nach Transformation von pFG1

3.2 Komplementation mit mutagenisiertem *cagA* mittels intrinsischem Plasmid

Aufgrund der erfolglosen Versuche die genomische *cagA* 3' repeat region von *H. pylori* zu modifizieren wurde die Klonierungsstrategie geändert. Anstatt das *cagA* Gen im Genom zu verändern wurde dieses komplett deletiert und ein modifiziertes *cagA* Gen wurde mit Hilfe eines *E.coli* – *H.pylori* Shuttle Vektors (pHel12) in den *H.pylori* B8 stamm eingebracht. Dazu wurden Plasmide mit *cagA* Sequenzen von Start-Codon bis Stop-Codon konstruiert. Auch hier enthielt ein Plasmid ein *cagA* mit fünf Phosphorylierungsstellen, der andere Vektor ein *cagA* ohne Phosphorylierungsstellen. Die Plasmide wurden in *H. pylori* B8 transformiert, dessen genomisches *cagA* zuvor eliminiert wurde. Die entstandenen Klone sind also *cagA*-Komplementationsmutanten, die das mutagenisierte *cagA* auf dem intrinsischen Plasmid tragen.

3.2.1 Herstellung der *cagA* Varianten auf dem Plasmid pLH

Das Ausgangsplasmid der Klonierungsarbeiten stellte das in der Arbeitsgruppe vorhandene und bekannte Plasmid pLH2 dar (Abb. 3.5). Das auf diesem Plasmid befindliche *babA*-Gen wird von homologen Sequenzen zu pHel12, dem Plasmid des Stammes P12, flankiert. Es verfügt über eine cat-Kassette, die dem Bakterium Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt. Des Weiteren ist auf pLH2 dem jeweiligen Insert ein *alpA*-Promotor vorgeschaltet. Mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NotI* wurde *babA* aus dem backbone ausgeschnitten. Von den Plasmiden pRH-H274 (fünf EPIYA Motive) und pRH-H275 (fünf EPIFA Motive) wurden unter Verwendung der Primer 1314 und 1315 die sich darauf befindlichen *cagA* Varianten vom Start-Codon bis zum Stop-Codon komplett amplifiziert. Das Primerpaar ist dabei so konzipiert, dass am Start von *cagA* eine *NdeI*-Schnittstelle und am Stop-Codon eine *NotI*-Schnittstelle eingefügt wird. Auf diesen Amplifikaten ist bei 1066 – 1071 bp eine zusätzliche *NdeI*-Schnittstelle vorhanden. Diese konnte mit einer *overlap*-PCR, wie sie im Kapitel 2.2.4.5 beschrieben ist, entfernt werden. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in pLH ligiert und in One Shot® TOP10 *E. coli* transformiert. Die daraus reisolierten Plasmide pLH-274 und pLH-275 wurden auf ihre Richtigkeit hin sequenziert.

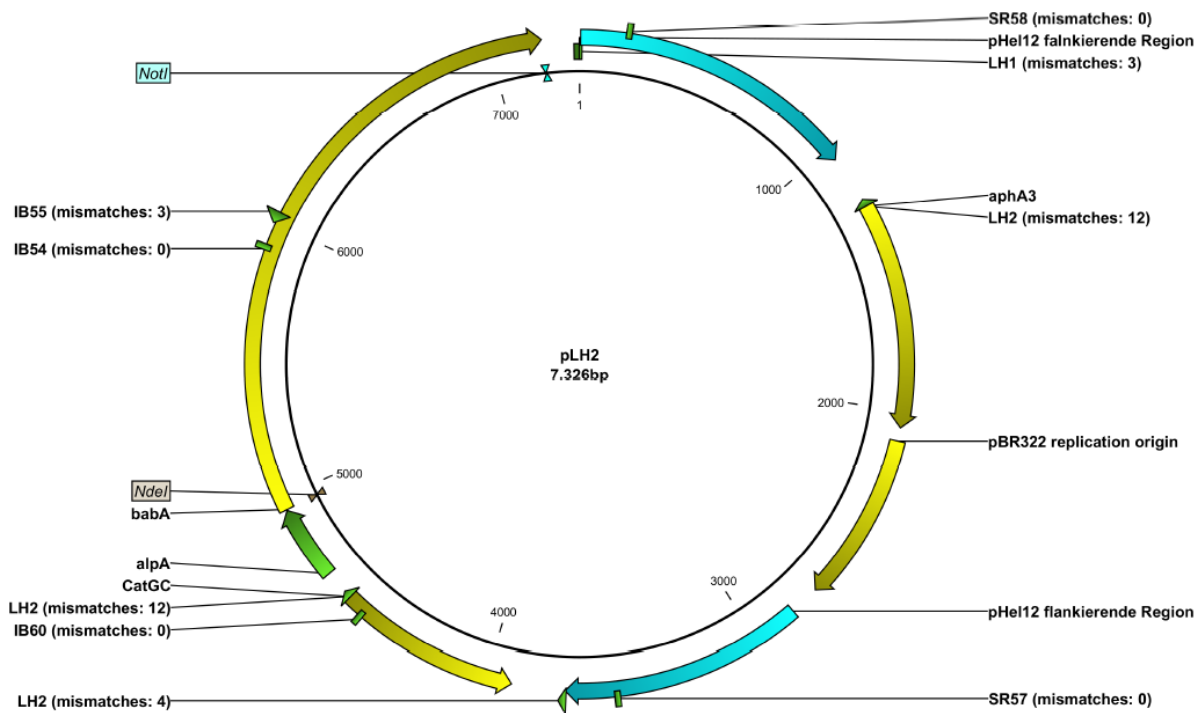


Abb. 3.5: Das Plasmid pLH2

pSMART HC Kan Vector (Lucigen) mit pHel12-homologen flankierenden Sequenzen und *alpA* Promotor. Das *babA*-Gen kann mit *NdeI* und *NotI* aus dem backbone ausgeschnitten und gegen *cagA* Varianten ausgetauscht werden.

3.2.2 Transformation der Plasmide in *H. pylori cagA*-Deletionsmutanten

Als nächstes wurden die Plasmide pLH-274 und pLH-275 in *H. pylori* Stämme transformiert. Um die unerwünschte Rekombination von genomischem und auf dem Plasmid codiertem *cagA* zu verhindern, wurden die Plasmide in *H. pylori* Mutanten, welchen die genomische *cagA* Sequenz entfernt wurde, transformiert. Diese Deletionsmutanten ($\Delta cagA$) wurden durch Transformation von pEL1 in den Wildtypstämme P12 und B8 hergestellt (Abb. 3.6). Dabei wird *cagA* durch eine *aphA3* Kasette ersetzt. Die Klone konnten deshalb auf Kanamycin-haltigem Nährboden selektioniert werden.

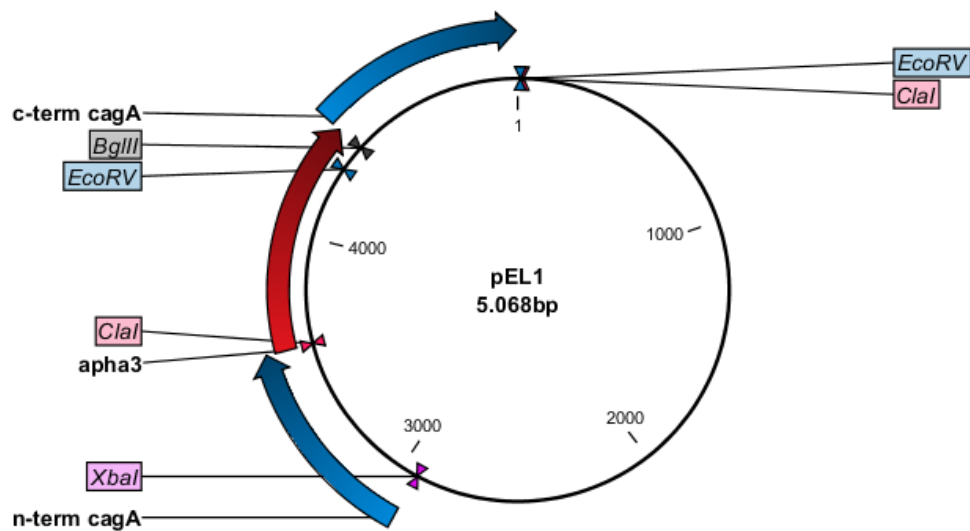


Abb. 3.6: Das Plasmid pEL1 zur Herstellung von *H.pylori-cagA*-Deletionsmutanten

pBlueskript-Vektor mit Kanamycin Resistenz-Kassette *aphA3* die von *cagA*-homologen Bereichen eingefasst wird. Nach Transformation in *H.pylori* und Rekombination wird das genomische *cagA* komplett durch die *aphA3* Kassette ersetzt.

Die zwei pLH Plasmide konnten mittels Elektroporation erfolgreich in P12Δ*cagA* transfiziert werden. Dabei rekombinieren die *inserts* der pLH Plasmide aufgrund der pHel12-homologen, flankierenden Sequenzen in das, dem Stamm P12 eigene, Plasmid pHel12.

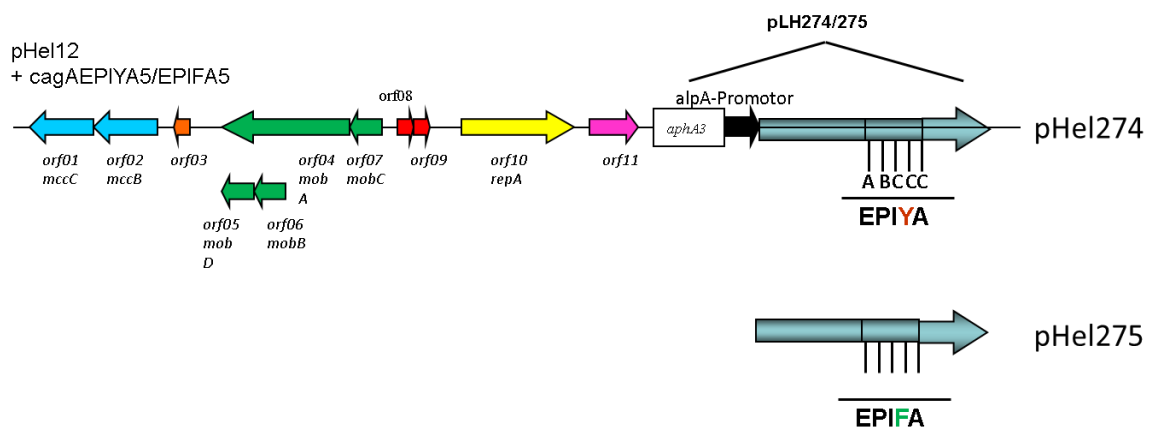


Abb. 3.7: Darstellung des Plasmides pHel12 des Stammes P12 mit seinen einzelnen *open reading frames* und des jeweiligen inserierten *cagA* der daraus entstehenden Plasmide pHel274 und pHel275

Die daraus reisolierten Plasmide pHel274 und pHel275 wurden in B8 Δ cagA transfiziert. Mit Chloramphenicol konnte auf die korrekten Klone B8 Δ cagA274 und B8 Δ cagA275 selektioniert werden. Im Western Blot wurde für beide Mutanten die Produktion von CagA nachgewiesen (Abb. 3.8).

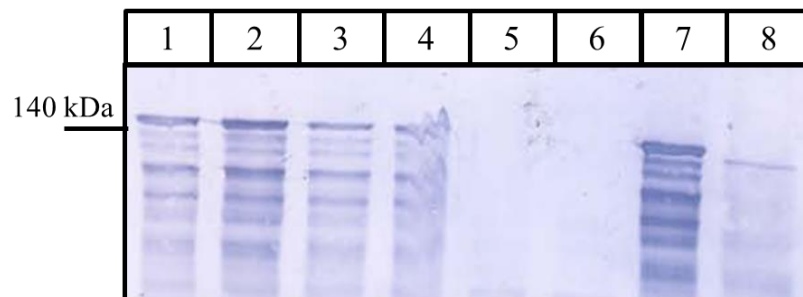


Abb. 3.8: Western Blot auf CagA einiger Klone von B8 Δ cagA274 und B8 Δ cagA275

Dargestellt sind die originalen Western Blot-Membranen. Die Proteinauftrennung erfolgte im 8 % PAA-Gel. Der Nachweis erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen den N-Terminus von CagA (AK268) in der Verdünnung 1:2000. Bei CagA Expression ist eine Farbbande im Bereich von ca. 140 kDa zu sehen.

1-4: B8 Δ cagA274 Klone; 5,6: B8 Δ cagA; 7: B8 Δ cagA275; 8: P12 Δ cagA::cagA-HA

Mittels PCR konnte zudem gezeigt werden, dass das produzierte CagA von den erfolgreich transformierten Plasmiden pHel274 und pHel275 codiert wird (Abb. 3.9).

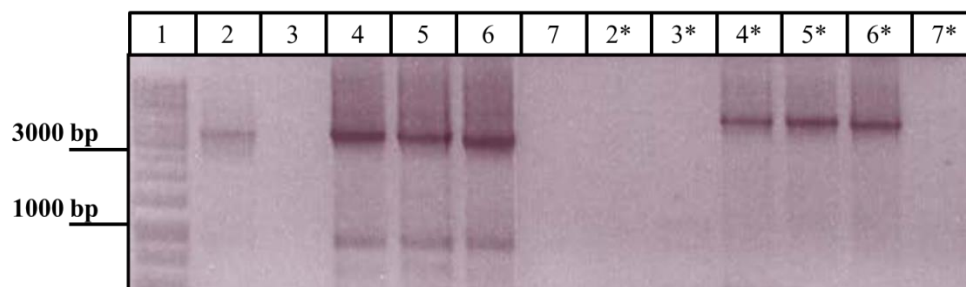


Abb. 3.9: PCR mit Nachweis von *cagA* und pHel der Mutanten B8 Δ cagA274 und B8 Δ cagA275

In den Spalten 2 bis 7 sind die Produkte der PCR auf *cagA* mit den Primern 1314 & 1315 aufgetragen, in den Spalten die mit * markiert sind die Produkte der PCR zum Nachweis des pHel Plasmides. Die hierfür verwendeten Primer 1890 & 1891 binden ca 400 bp *upstream* bzw. *downstream* der *inserts* am pHel backbone.

1: 10 kbp DNA Ladder (Fermentas); 2: B8 wt; 3: B8 Δ cagA; 4: B8 Δ cagA274; 5: B8 Δ cagA275;

6: B8 Δ cagApHel216; 7: Negativkontrolle

Die Mutanten B8 Δ cagA274, B8 Δ cagA275 und der B8 Wildtyp wurden mit AGS Zellen inkubiert. Dabei zeigte sich im Phosphotyrosinblot der Zelllysate eine deutlich prominentere Bande bei der Mutante mit fünf Phosphorylierungsmotiven im Vergleich zum B8 Wildtyp mit

drei EPIYA Motiven. Bei der Mutante mit fünf EPIFA Motiven kann man kaum eine Bande ausfindig machen (siehe Abb. 3.10). Die Injektion von CagA in die Zelle mittels T4SS funktioniert bei diesen Mutanten. Die Klone werden intrazellulär nach der Quantität ihrer EPIYA Motive phosphoryliert.

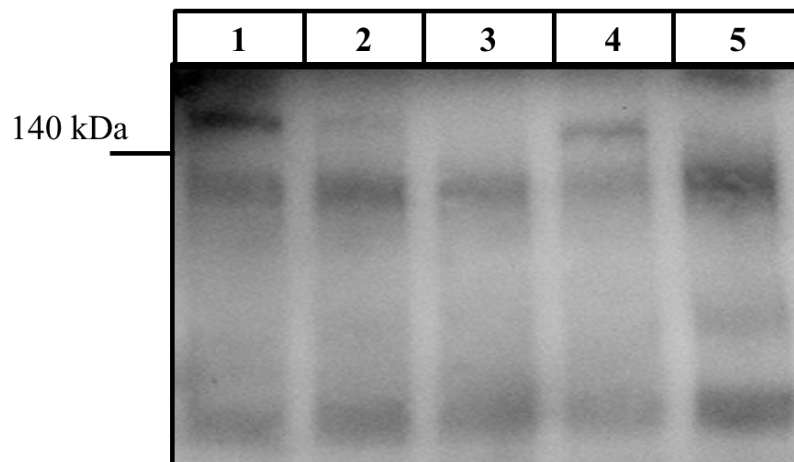


Abb. 3.10: Phosphotyrosinblot der Mutanten B8 Δ cagA274 und B8 Δ cagA275

Nach Inkubation mit AGS Zellen wird B8 Δ cagA274 (Spalte 1) intrazellulär deutlich stärker phosphoryliert als der B8 Wildtyp (Spalte 4). B8 Δ cagA275 (Spalte 2) wird kaum phosphoryliert. Die Detektion erfolgte durch Umsetzung von Luminol durch eine an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase.

1: B8 Δ cagA274; 2: B8 Δ cagA275; 3: B8 Δ cagA; 4: B8 Wildtyp; 5: Zelllysat nicht-infizierter Zellen

3.2.3 Kolonisierungsversuche im Mongolischen Gerbil

Die erfolgreich konstruierten *H. pylori* Mutanten B8 Δ cagA274 und B8 Δ cagA275 wurden auf ihre Kolonisierungsfähigkeit im Mongolischen Gerbil untersucht. Dazu wurden je drei Tieren die Bakteriensuspension in den Magen appliziert und nach sechs Wochen Inkubationszeit getötet. Als positive Kontrolle wurden zwei Gerbils mit dem Wildtyp des hier verwendeten B8 Klon ohne transformiertes Plasmid infiziert. Aus den Mägen der Tiere konnten keine Klone der Bakterien reisoliert werden. Daraufhin wurden 14 Tiere mit der vermeintlichen Positivkontrolle (Wildtyp B8-Klon) für drei bis vier Wochen infiziert. Auch hier ließ sich kein *H. pylori* aus den Mägen der Tiere anzüchten. Das lässt darauf schließen, dass nicht zwangsläufig die Plasmide pHel274 und pHel275 und deren codiertes CagA für die Unfähigkeit zur Kolonisierung im Gerbil-Magen verantwortlich sind. Scheinbar hat der hier verwendete B8 Stamm die Fähigkeit zur Kolonisierung verloren.

3.3 Charakterisierung klinischer *H. pylori* Isolate

In diesem Teil der Arbeit wurden klinische *H. pylori* Isolate des Karolinska Institutes in Solna, Schweden charakterisiert in der Absicht, eine Alternative zu dem Stamm B8 zu finden. Kolonisierungsversuche sollten zeigen, ob sich unter den Isolaten ein Stamm befindet, der die Voraussetzungen für Wachstum im Magen des Mongolischen Gerbils hat. Des Weiteren wurde die Expression der Virulenzfaktoren CagA und VacA untersucht sowie deren genomische Sequenzen kategorisiert. Diese umfangreiche Charakterisierung bildet die Grundlage für zukünftige Experimente mit den Isolaten.

Parallel zu diesen Arbeiten wurden in unserer Arbeitsgruppe *H. pylori* Stämme aus Nigeria, mit welchen im Zuge einer Kooperation mit Dr. Stella Smith (Nigerian Institute for Medical Research; Lagos, Nigeria) gearbeitet wird, untersucht. Hierbei handelt es sich um Patientenisolat und sie wurden unter anderem auf die Kolonisierungsfähigkeit im Mongolischen Gerbil getestet. In der folgenden Abhandlung der Ergebnisse wird auf die Isolate aus Nigeria an letzter Stelle eingegangen.

3.3.1 Kolonisierung im Mongolischen Gerbil

Eine geeignete Alternative zu *H. pylori* B8 muss ein Stamm sein, der im Magen des Gerbils kolonisieren kann. Zu diesem Zweck wurden die zehn Isolate des Karolinska Institutes in zwei Gruppen aufgeteilt und jeweils eine Bakteriensuspension, die alle Stämme der Gruppe enthält hergestellt. Damit wurden jeweils sechs Tiere infiziert und nach drei bis vier Wochen (wie in 2.2.1 beschrieben) getötet. Zur Reisolierung der Bakterien wurde der Magen in Antrum und Korpus getrennt aufbereitet und ausplattiert, und die *colony forming units* pro Gramm Magengewebe bestimmt. Aus allen sechs Gerbils, die mit dem Karolinska Mix 1 infiziert wurden, konnten Klone aus dem Antrum reisoliert werden (Tab. 3.1). Von den Isolaten aus dem Bakterienmix 2 kolonisierte keiner im Magen der Tiere.

Infektionszeit	Infektion mit	Tier Nr.	cfu/g Magen
3 Wochen	Karolinska Mix 1	843	14286
3 Wochen	Karolinska Mix 1	844	38462
4 Wochen	Karolinska Mix 1	849	38462
4 Wochen	Karolinska Mix 1	850	54286
4 Wochen	Karolinska Mix 1	851	8750
4 Wochen	Karolinska Mix 1	852	28333

Tab. 3.1: Tabellarische Auswertung der Kolonisierungsversuche mit Karolinska Mix 1

Alle Reisolat aus dem Magen der Gerbils konnten daraufhin mittels *randomly amplified polymorphic DNA* – PCR mit den Primern RH1254 und RH1281 dem Karolinska-Stamm P271 zugeordnet werden (Abb. 3.11).

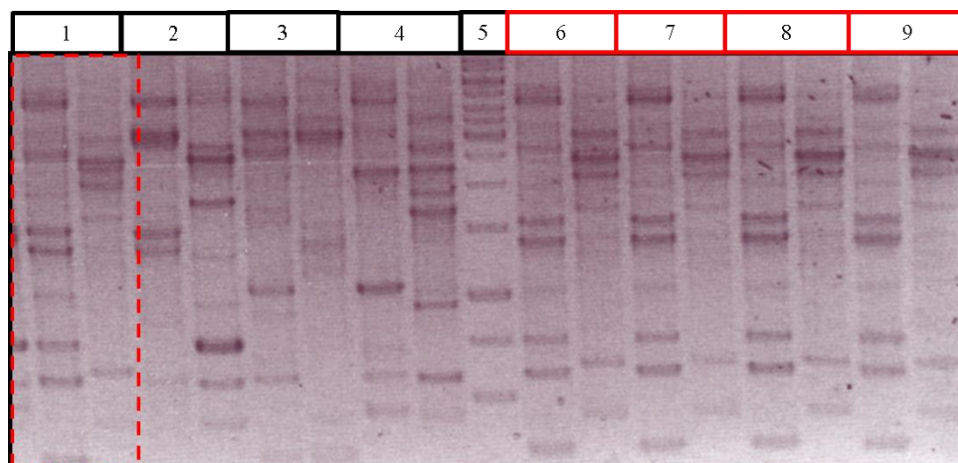


Abb. 3.11: RAPD – PCR der Reisolat des Karolinska Mix 1

Zur Identifikation der Reisolat der Mischinfektionen wurden RAPD – PCRs (Primer RH1245 und RH1281) sowohl der im Bakterienmix 1 enthaltenen Stämme und der Reisolat durchgeführt. Auf der Abbildung sind links des Standards (Spalte 5) die Ausgangsstämme und rechts die Reisolat aufgetragen. Die Bandenmuster der Reisolat sind identisch mit denjenigen des in Spalte 1 aufgetragenen Stammes P271. Dies ist durch die rote Markierung verdeutlicht.

1: P271; 2: P273; 3: P275; 4: P276; 5: DNA standard ladder; 6 – 9: verschiedene Reisolat aus dem Tier mit der Versuchsnummer 843. Pro Stamm wurden je eine PCR mit RH1245 und eine PCR mit RH1281 durchgeführt und beide Reaktionsprodukte auf das Gel aufgetragen.

3.3.2 Expressionsanalysen von *cagA* und *vacA* Genen

Zur Untersuchung der Bakterienisolate auf die Produktion der Virulenzfaktoren CagA und VacA wurden Bakterienlysate hergestellt (s. 2.2.2.5). Der Nachweis der Proteine erfolgte im

Western Blot mittels AK268 (Verdünnung 1:2000). Es konnten bei acht der zehn Isolate die Produktion von CagA festgestellt werden. Die Stämme P259 und P275 zeigten keine Produktion von CagA. Als positive Kontrolle diente der CagA positive *H. pylori*-Stamm P12, als negative Kontrolle eine P12 Mutante ohne *cag*-Pathogenitätsinsel (P12 Δ *cagPAI*) und somit ohne CagA (Abb. 3.12).

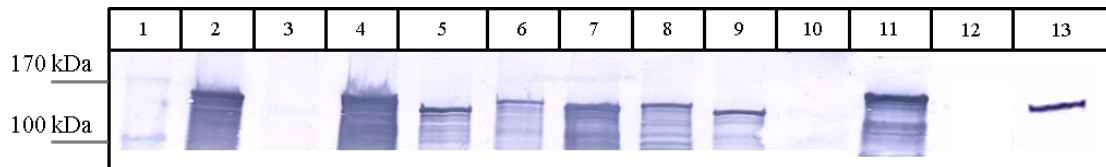


Abb. 3.12: Western Blot auf CagA, Karolinska Stämme

Dargestellt sind die originalen Western Blot-Membranen. Die Proteinauftrennung erfolgte im 8 % PAA-Gel. Der Nachweis erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen den N-Terminus von CagA (AK268) in der Verdünnung 1:2000. Bei CagA Expression ist eine Farbbande im Bereich zwischen ca. 130 bis 150 kDa zu sehen.

1: Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2: P12; 3: P259; 4: P267; 5: P269; 6: P270; 7: P272; 8: P273; 9: P274; 10: P275; 11: P276; 12: P12 Δ *cagPAI*; 13: P271

Der Virulenzfaktor *Vacuolating Cytotoxin A* (VacA) wurde in sechs der elf Stämme mittels α -VacA-Antikörper (AK197 1:1000 eingesetzt) nachgewiesen. Es handelt sich dabei um die Stämme P259, P267, P269, P273, P274, P276. Als positive Kontrolle wurde auch hier der Stamm P12 verwendet (Abb. 3.13).



Abb. 3.13: Western Blot auf VacA, Karolinska Stämme

Dargestellt sind die originalen Westernblot-Membranen. Die Proteinauftrennung erfolgte im 8 % PAA-Gel. Der Nachweis erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen die Aminosäuren 97-723 von VacA (AK 197) in der Verdünnung 1:1000.

1: Prestained Protein Ladder (Fermentas); 2: P12; 3: P259; 4: P267; 5: P269; 6: P270; 7: P272; 8: P273; 9: P274; 10: P275; 11: P276; 12: P12 Δ *cagPAI*; 13: P271

3.3.3 Genetische Kartierung der *cagA* und *vacA* Sequenzen

H. pylori ist ein Bakterium mit großer genetischer Diversität. Aus diesem Grunde sollten die Virulenzfaktoren nach ihrer genomischen Sequenz eingeteilt werden. Dazu wurden die Gene mittels PCR amplifiziert und anschließend kategorisiert. Durch Amplifikation der *cagA* 3' *repeat region* konnten die Stämme aufgrund ihrer Sequenz in *western type strains* und *east-asian type strains* eingeteilt werden [48]. Die Anzahl der Tyrosinphosphorylierungsstellen wurde ebenfalls durch Sequenzierung bestimmt (siehe Tab. 3.4). Mit zwei Oligonukleotidpaaren konnten bei zehn der elf Stämme die zu untersuchenden Regionen amplifiziert werden, wobei die Oligonukleotide CAGTR und WS423 so konstruiert wurden, dass sie in den hochkonservierten Regionen von *cagA* binden. Die *cagA* Region des Stammes P275 konnte nicht amplifiziert werden. Die hier untersuchten *cagA*⁺-Stämme sind ausnahmslos *western type strains*, besitzen also EPIYA-A, EPIYA-B und EPIYA-C Motive. Im Gegensatz zu *cagA* Allelen konnte in allen Stämmen die verschiedenen *vacA* Allele amplifiziert werden. Das *vacuolating cytotoxin gene* enthält drei polymorphe Regionen: die *signal (s) region*, die *midregion (m)* und die *intermediate (i) region*. Die Typisierung erfolgte mittels Allel-spezifischer Polymerase-Ketten-Reaktion. Die Signal-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden VA1F und VA1R amplifiziert und bildet ein 259 bp langes Produkt als *vacA* s2-Typ und ein 286 bp großes als *vacA* s1-Typ. Die untersuchten Stämme haben alle eine Signal Region vom Typ 1, wie auch der *vacA* s1 *H. pylori* Kontrollstamm 26695 (Abb. 3.14). Mit den Oligonukleotiden VAG-F und VAG-R entsteht entweder ein PCR Produkt von 567 bp (m1) oder 642 bp (m2) Länge, je nach Größe der *midregion*. Die Stämme P259, P270, P271, P273 und P276 besitzen die m1-Region. P267, P269, P272, P274 und P275 sind vom Typ m2 (Abb. 3.15). Die intermediäre Region vom Typ 1 lässt sich nur mit den Oligonukleotiden VacF1 und C1R amplifizieren. Bei den Stämmen P259, P267, P270, P271, P272, P273, P274, P275, P276 war dies möglich. Das i2-Typ Allel kann mit den Oligonukleotiden VacF1 und C2R synthetisiert werden. Eine *intermediate region* Typ2 hat der Stamm P269 (Abb. 3.16).

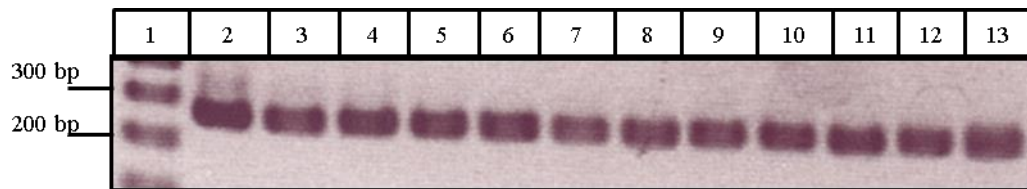


Abb. 3.14: Amplifikation und Einteilung der *vacA* signal region, Karolinska Stämme

Es wurde ein PCR mit den Oligonukleotiden VA1F und VA1R durchgeführt, um die *signal region* der Stämme zu charakterisieren. Abgebildet sind die detektierten PCR-Amplifikate nach Gelelektrophorese im 1 % Agarosegel. Alle Stämme besitzen eine Signalregion vom Typ 1.

1: 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); 2: 26695; 3: P259; 4: P267; 5: P269; 6: P270; 7: P271; 8: P272; 9: P273; 10: P274; 11: P275; 12: P276; 13: B8

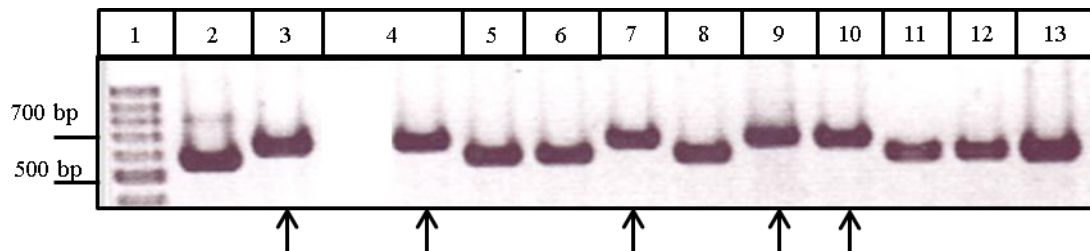


Abb. 3.15: Amplifikation und Einteilung der *vacA* midregion, Karolinska Stämme

Dargestellt sind die Aufnahmen der gelelektrophoretisch aufgetrennten Banden der PCR zur Klassifikation der *vacA* midregion mit den Oligonukleotiden VAG-F und VAG-R. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Banden entsprechen der 642 bp langen midregion Typ 2, die ungekennzeichneten Amplifikate entsprechen Typ 1.

1: 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); 2: P259; 3: P267; 4: P269; 5: P270; 6: P271; 7: P272; 8: P273; 9: P274; 10: P275; 11: P276; 12: P12; 13: 26695

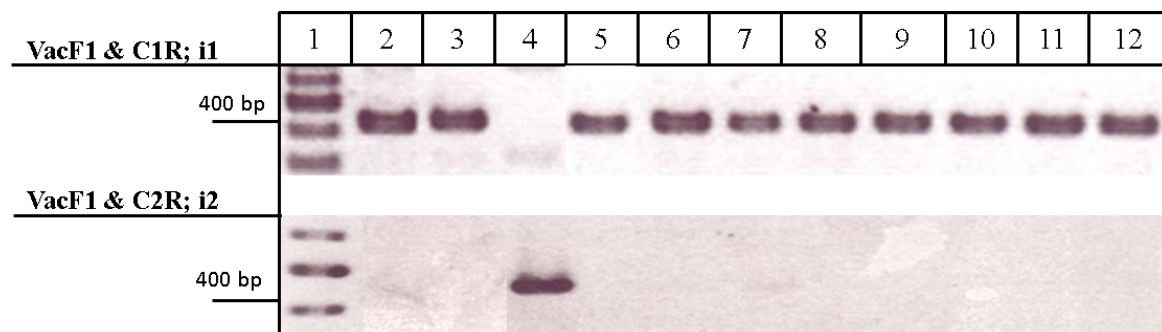


Abb. 3.16: Amplifikation und Einteilung der *vacA* intermediate region, Karolinska Stämme

Dargestellt sind die Reaktionsprodukte einer PCR zur Einteilung der *vacA* intermediate region. Die obere Reihe listet Reaktionsprodukte der PCR unter Verwendung der Oligonukleotide VacF1 und C1R. Darunter sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten Banden einer PCR mit den Oligonukleotiden VacF1 und C2R dargestellt.

1: 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas); 2: P259; 3: P267; 4: P269; 5: P270; 6: P271; 7: P272; 8: P273; 9: P274; 10: P275; 11: P276; 12: P12

3.3.4 CagA Tyrosinphosphorylierung

CagA wird durch das Typ IV Sekretionssystem (T4SS) der *cagPAI* in die Wirtszelle injiziert und dort durch Kinasen der SRC Familie an Tyrosinen der EPIYA-Sequenzen phosphoryliert. Phosphoryliertes CagA interagiert mit weiteren Wirtsproteinen, zum Beispiel mit der Tyrosin-Phosphatase SHP2, und führt unter anderem zur Ausschüttung von Zytokinen (IL-8) und Dysregulationen von Zellmorphologie und Zellwachstum [99, 106, 107].

Nachdem die Stämme auf CagA Expression und Typus untersucht wurden, konnte mittels des Tyrosinphosphorylierungsassays die Funktionalität des Typ IV Sekretionssystems gezeigt werden. Unter allen CagA exprimierenden Isolaten konnte bei sechs von acht Klonen die Phosphorylierung an Tyrosin-Resten im C-terminalen Bereich von CagA festgestellt werden. Keine intrazelluläre Phosphorylierung erfolgte bei den Stämmen P259, P269, P274 und P275 (Abb. 3.17). Diese Stämme besitzen kein funktionierendes T4SS.

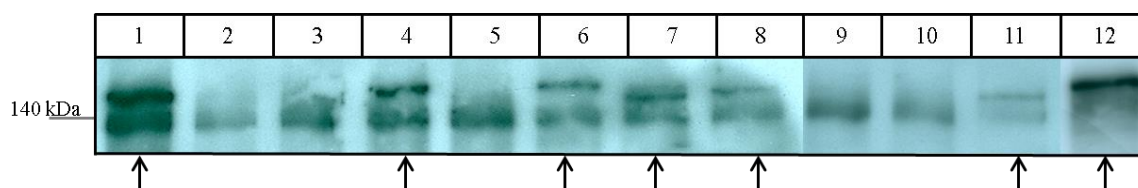


Abb. 3.17: CagA Tyrosinphosphorylierung, Karolinska Stämme

CagA wird von Wirtskinasen an den EPIYA Motiven phosphoryliert. Die Detektion erfolgte durch Umsetzung von Luminol durch eine an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Banden zeigen positive CagA Phosphorylierung.

1: P12; 2: Negativ-Kontrolle; 3: P259; 4: P267; 5: P269; 6: P270; 7: P272; 8: P273; 9: P274; 10: P275; 11: P276; 12: P271

3.3.5 IL-8 Induktion *in vitro*

Die Translokation von CagA in die Magenschleimhautzellen führt dort zu einer Ausschüttung von verschiedenen Chemokinen, unter anderem Interleukin 8 [24]. Neuere Studien belegen aber auch eine von der CagA Injektion unabhängige, inflammatorische Reaktion mit IL-8 Ausschüttung der Wirtszellen [39]. In beiden Fällen korrelieren die IL-8 Expression mit der Schwere der Entzündung im histologischen Gewebeschnitt. Die Intensität der entzündung die ein *H. pylori* Stamm auslöst kann somit anhand der IL-8 Induktion bestimmt werden [6]. Die IL-8 Konzentrationen im Überstand von eukaryotischen Zellen nach Inkubation mit den

Bakterien wurde wie in 2.2.6 beschrieben gemessen. Als positive Vergleichsstämme wurden die Zellen neben den zu untersuchenden Isolaten auch mit den Stämmen B8 und P12 infiziert. Die Stämme P267 und P272 induzierten mit im Mittel ca. 1800 pg/ml bzw. 1700 pg/ml eine höhere IL-8 Ausschüttung der Zellen als die gut charakterisierten Vergleichsstämme B8 (ca. 1100 pg/ml) und P12 (ca. 1200 pg/ml). Die restlichen Stämme, die eine funktionelle CagA Translokation zeigen, also in den Phosphorylierungsexperimenten positiv waren, verursachen eine IL-8 Induktionen, die im Bereich der Referenzstämmen liegen. Die gerundeten Mittelwerte lagen zwischen 860 pg/ml und 1310 pg/ml an ausgeschüttetem IL-8. Die Stämme, deren CagA nicht in die Wirtszelle injiziert wird, induzieren kaum IL-8 Expression. P259 und P275 induzieren IL-8 Ausschüttungen von unter 100 pg/ml. Auffällig war die IL-8 Induktion der Stämme P269 und P274, die ebenfalls kein funktionelles T4SS haben. Die Versuche ergaben gemittelt ca. 400 pg/ml bei P269 und ca. 860 pg/ml bei dem Stamm P274.

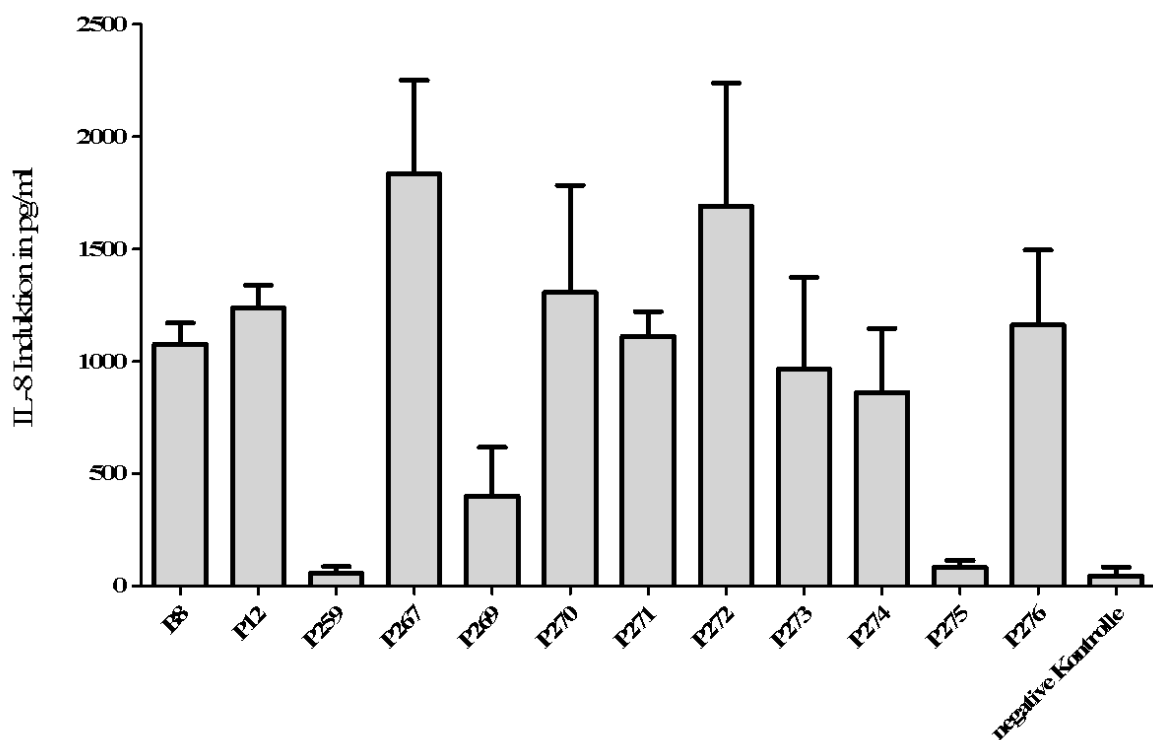


Abb. 3.18: IL-8 Induktion in AGS-Zellen nach Inkubation mit den Karolinska Stämmen

Auf der X-Achse sind die zu untersuchenden Stämme aufgelistet. Die Y-Achse zeigt die vom Bakterium induzierte IL-8 Expression in pg/ml im Zellinkubationsexperiment. AGS-Zellen und Bakterien wurden für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die angegebenen Werte und Abweichungen sind aus drei Versuchen gemittelt.

B8: 1074,84 pg/ml; P12: 1236,8 pg/ml; P259: 55,8 pg/ml; P267: 1834,3 pg/ml; P268: 1283,9 pg/ml; P269: 399,7 pg/ml; P270: 1306,4 pg/ml; P271: 1111,5 pg/ml; P272: 1691,7 pg/ml; P273: 964,9 pg/ml; P274: 860,7 pg/ml; P275: 82,2 pg/ml; P276: 1161,7 pg/ml; negative Kontrolle: 45,1 pg/ml

3.3.6 Nigerianisches Patientenisolat *H. pylori* 1-20A

Im Rahmen einer Kooperation mit dem ‚Nigerian Institute for Medical Research‘ in Lagos, Nigeria, wurden 20 klinische Isolate von *H. pylori* typisiert. Auch hier wurden Kolonisierungsversuche im Gerbil durchgeführt. Die Expression der Virulenzfaktoren CagA und VacA wurde im Western Blot analog zu den Stämmen des Karolinska Institutes untersucht. Ebenso wurde nach Inkubation der Klone mit AGS-Zellen die IL-8 Induktion im Überstand gemessen, die intrazelluläre CagA Phosphorylierung im Western Blot nachgewiesen, sowie die zytotoxische Aktivität der Vakuolisierung [62] im Mikroskop bestimmt.

Die Kolonisierungsfähigkeit des Stammes 1-20A wurde in einem Mischinfektionsversuch verschiedener *H. pylori* Isolate nachgewiesen (Abb. 3.19). Durch *fingerprinting* mittels *randomly amplified polymorphic DNA* – PCR konnten die Reisolat den Stämmen zugeordnet werden (Abb. 3.20).

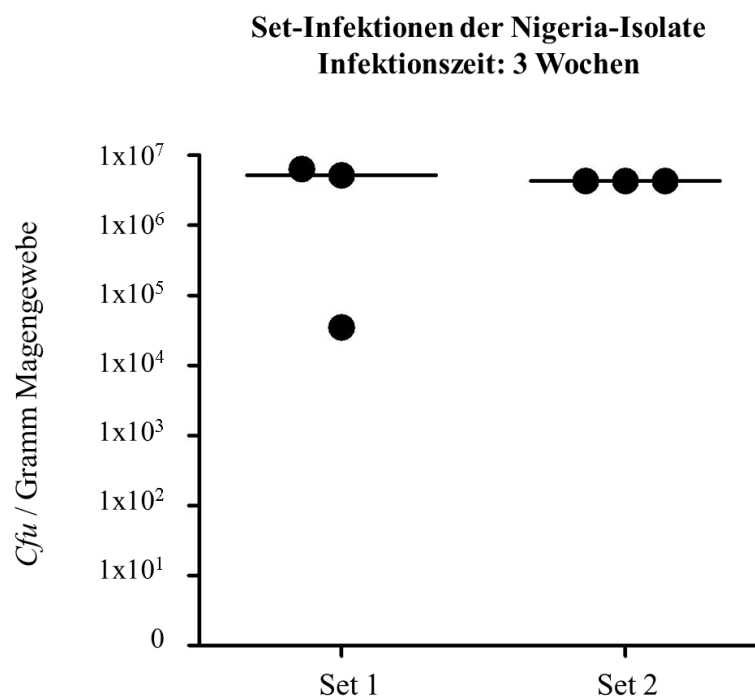


Abb. 3.19: Graphische Auswertung der Kolonisierungsversuche im Gerbil der *H. pylori*- Nigeria-Isolate

Je drei Gerbils wurden dreimalig mit einer Bakteriensuspension verschiedener Stämme infiziert und nach drei Wochen getötet. Die in der Graphik zu sehenden Punkte stehen je für die ausgezählte cfu eines Versuchstieres.

Nigeria-Isolate in Set 1: 1-14A, 1-17C, 1-20A, 1-31A, 1-39C, 1-43A

Nigeria-Isolate in Set 2: 1-47A, 1-77C, 2-29A, 5-6A, 5-6C, 6-5A

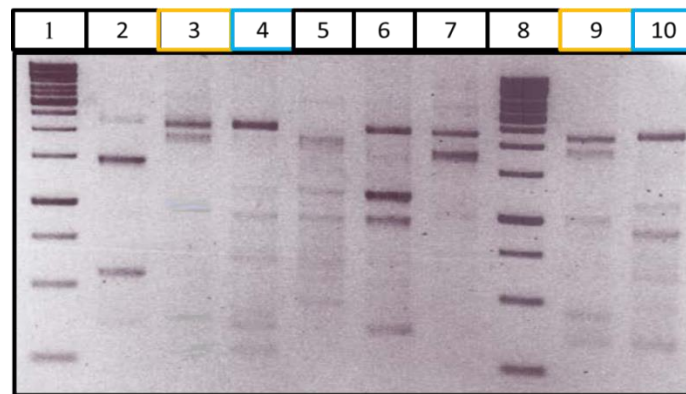


Abb. 3.20: RAPD – PCR der Nigeria-Isolate des Infektionssets 1

Zur Identifikation der Reisolat der Mischinfektionen wurden RAPD – PCRs (Primer 1857) sowohl der im Set 1 enthaltenen Stämme und der Reisolat durchgeführt. Auf der Abbildung sind links des Standards (Spalte 8) die Ausgangsstämme und rechts exemplarisch die zwei verschiedenen Reisolat aufgetragen.

1: DNA standard ladder; 2: 1-14A; 3: 1-17C; 4: 1-20A; 5: 1-31A; 6: 1-39C; 7: 1-43A; 8: DNA standard ladder; 9: 1-17C; 10: 1-20A

Neben der Fähigkeit im Magen des Mongolischen Gerbils zu kolonisieren exprimiert der Stamm 1-20A CagA und vakuolisierendes VacA. Er verfügt über einen funktionsfähigen Typ IV Sekretionsapparat und induziert in AGS-Zellen starke IL-8 Ausschüttung (Tab. 3.3).

Nigerianisches Patientenisolat 1-20A	
Kolonisierung im Gerbil	+
CagA Expression	+
VacA Expression	+
<i>vacA</i> Genotyp	s1 / m1
Vacuolisierung	+
Tyrosinphosphorylierung	+
IL-8 Induktion	+

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Charakteristika von *H. pylori* 1-20A

3.3.7 Zusammenfassung der Charakterisierung verwendeter Stämme

Die in diesem Teil der Arbeit durchgeführte Charakterisierung verschiedener *H. pylori* Stämme (B8wt, Stämme des Karolinska Institutes, nigerianisches Patientenisolat 1-20A) bildet die Grundlage für weitere Experimente mit diesen Isolaten. In Bezug auf die Suche nach einem Alternativstamm für tierexperimentelle Versuche im Gerbil konnten zwei Klone identifiziert werden: der Karolinska-Stamm P271 und das nigerianische Patientenisolat 1-20A. *H. pylori* Stämme, die sowohl eine funktionsfähige *cagPAI* besitzen als auch vakuolisierendes VacA vom Typ s1/m1 exprimieren, gehen beim Menschen mit einer stärkeren Inflammation der Magenschleimhaut und mit Magenkarzinomen einher [97]. Es bietet sich daher an mit dem Stamm 1-20A die Experimente aus Kapitel 3.2 fortzuführen. Das Karolinska-Isolat P271 wie auch der Ausgangsstamm B8 exprimieren nur CagA, kein funktionsfähiges VacA.

	CagA Expression	Anzahl EPIYA Motive	<i>cagA</i> Genotyp	VacA Expression	<i>vacA</i> Genotyp	P- Tyr	IL-8 Induktion (pg/ml)	Koloni- sierung im Gerbil
P259	-	4	western	+	s1/m1/i1	-	-	-
P267	+	4	western	+	s1/m2/i1	+	++	-
P269	+	3	western	+	s1/m2/i2	-	+	-
P270	+	4	western	-	s1/m1/i1	+	++	-
P271	+	3	western	-	s1/m1/i1	+	++	+
P272	+	3	western	-	s1/m2/i1	+	++	-
P273	+	3	western	+	s1/m1/i1	+	+	-
P274	+	2	western	+	s1/m2/i1	-	+	-
P275	-	<i>Kein cagA</i>		-	s1/m2/i1	-	-	-
P276	+	3	western	+	s1/m1/i1	+	++	-

Tab. 3.3: Zusammenfassung der Charakteristika der klinischen *H. pylori* Isoate des Karolinska Institutes

Referenzwerte für die IL-8 Induktion in pg/ml: - (<100 pg/ml); + (100-1000 pg/ml); ++ (>1000 pg/ml)

4 DISKUSSION

Mehr als 50 % der Weltbevölkerung sind mit *H. pylori* infiziert [59]. Die Entstehung von chronischer Gastritis, Duodenalulkus und Magenkrebs sind mit diesem, als Typ I Karzinogen klassifizierten Pathogen assoziiert [1, 9]. *H. pylori* werden eingeteilt in *cagA*-positive und *cagA*-negative Stämme, wobei erstere potenter sind in der Auslösung von Pathologien [83, 105]. Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori* ist die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*), die für das Effektorprotein CagA und das Typ IV Sekretionssystem codiert, welches CagA in die Magenschleimhaut des Wirtes injiziert [14, 112]. Intrazellulär wird CagA an den Tyrosin-Resten der C-terminalen Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) Motiven von Wirtskinasen der SRC und Abl Familien phosphoryliert [84, 106]. Tyrosin-phosphoryliertes CagA wiederum bindet und aktiviert das Onkoprotein SHP-2 [43], eine Tyrosin Phosphatase, deren Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen die Wirtszelle maligne entarten lässt [110].

Um die neoplastischen Aktivitäten von CagA und der EPIYA Motive im Speziellen *in vivo* näher untersuchen zu können existieren bisher nur unzureichende Tiermodelle, wie beispielsweise CagA transgene Mäuse von Hatekeyama *et al.* [80]. So konnte mit diesem Modell zwar eine CagA-abhängige abnormale Proliferation von Magenepithelzellen und hämatopoetischen Zellen festgestellt werden, doch kommt die systemische Expression von CagA in allen Körperzellen der Maus der Physiologie einer *H. pylori*-Infektion nicht sehr nahe. Die Experimente und Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für die Entwicklung eines Tiermodelles, das die Untersuchung der Rolle von CagA und seiner EPIYA Motive im physiologischen Rahmen einer *H. pylori* Infektion *in vivo* gestattet.

4.1 Klonierungen in *H. pylori* B8

Zu Beginn der Arbeit sollte die genomische *cagA* 3' repeat region von *H. pylori* B8, also der Sequenzabschnitt der für die Anzahl der EPIYA-Motive von CagA codiert, mittels einer Kontraselektionsmethode mutiert werden. Durch das Einbringen der *rpsL-erm*-Kassette und folgend durch deren Austausch gegen das Mutationskonstrukt kann vermieden werden, dass man das mutierte Allel mit einer Selektionsresistenz versehen muss. Die Transformation der Kassette in die EPIYA-Region von *H. pylori* B8 funktionierte problemlos. Jedoch konnten die Konstrukte mit fünf EPIYA oder fünf EPIFA Motiven nicht durch die Resistenzkassette ausgetauscht werden. Zwar wurde die *rpsL-erm*-Kassette aus dem Genom wieder entfernt, mit ihr aber auch das komplette *cagA*-Allel. In einer Studie von Dailidene *et al.* (2006) wurde die

Kontraselektion per *rpsL-erm*-Kassette in vier verschiedenen Genloci vier unterschiedlicher *H. pylori* Stämme durchgeführt [26]: *mdaB* (*quinone reductase*), *frxA* (Nitroreduktase), *fur* (Eisen-abhängige Regulation von intrazellulären Prozessen) und *nikR* (Nickel-abhängige Regulation von intrazellulären Prozessen); jeweils in den Stämmen 26695, SS1, X47 und G27MA. Die Ausbeute an korrekten $\text{Erm}^S \text{Str}^R$ Transformanten variierte abhängig von Allel und Stamm zwischen ~17 % und ~90 % bei je 30 untersuchten Klonen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich der *H. pylori* Stamm B8 anders verhält, wenn man dieselbe Methode für eine Änderung der Anzahl der EPIYA Motive von *cagA* anwendet. Interessanterweise konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe, ebenfalls mittels *rpsL-erm*-Kassette in der *cagA* 3' *repeat region*, eine B8 Mutante erzeugt werden, die anfänglich ein funktionsfähiges CagA-HA-Fusionsprotein exprimierte. In diesem Fusionsprotein wurde die Region der EPIYA Motive gegen die Sequenz des Membranproteins Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus ersetzt. Die Expression des Fusionsproteins wurde mit der Zeit jedoch von B8 abgeschaltet. Umso erstaunlicher ist es deshalb, dass es bei *H. pylori* B8 zu keiner homologen Rekombination der Konstrukte mit fünf EPIYA bzw. EPIFA Motiven, die an die gleiche Stelle wie das HA platziert werden sollten, gekommen ist. Mehr noch, dass das Bakterium die komplette *cagA*-Sequenz verloren hat. Es wäre anzunehmen, dass das Bakterium eine gentechnische Veränderung der Anzahl von Phosphorylierungsstellen im CagA Protein tolerieren müsste. *CagPAI* positive *H. pylori* Stämme sind auf Selektionsdruck hin *in vitro* selbst in der Lage, die Anzahl an EPIYA Motiven zu ändern. Zu einer Deletion von Virulenzfaktoren der *cagPAI* kommt es dabei nicht [18].

4.2 Kolonisierungsfähigkeit von *H. pylori* B8

Im Laufe dieser Arbeit beobachteten wir in verschiedenen Szenarien den Verlust der Kolonisierungsfähigkeit von *H. pylori* B8. Dieses Problem betraf einerseits ein B8 Isolat unserer Stammsammlung, andererseits konnte der Verlust der Kolonisierungsfähigkeit bei $\Delta cagA$ -Deletionsmutanten des als Wildtyp kolonisierenden Stammes B8 entdeckt werden.

Nachdem es gelungen ist, Mutanten mit Einbringen von Plasmid-DNA und gleichzeitiger Deletion des genomischen *cagA* in B8 herzustellen, wurden die Klone zu ersten Kolonisierungsversuchen benutzt (siehe Kapitel 3.2). Die B8 Mutanten zeigten sich dabei unfähig zur Kolonisierung im Gerbil-Magen. Daraufhin wurden Tiere mit dem Ausgangsstamm (B8 Wildtyp UB-H11) infiziert und ebenfalls keine Reisolat gewonnen. Ein anderes B8 Isolat (B8 EL-H5) aus unserer Stammsammlung hingegen kolonisierte in allen 24 Versuchstieren (Infektionszeit zwei bis fünf Wochen), die teilweise der gleichen Gerbil-Linie

der Tiere der UB-H11 Infektionen entstammten. Es stellt sich daher die Frage warum und welche Faktoren der Kolonisierungsfähigkeit diesem B8 Isolat (UB-H11) abhandengekommen sind. Denkbar wäre ein sukzessiver Verlust der Beweglichkeit mittels Flagellen, die essentiell für eine erfolgreiche Kolonisierung im Gerbil sind [52, 81]. Entgegen früheren Behauptungen hat sich das Vorhandensein des Enzyms Urease nicht als essentieller Kolonisierungsfaktor im Mongolischen Gerbil erwiesen [73].

Nachdem der Stamm UB-H11 nicht mehr kolonisieren konnte wurde eine $\Delta cagA$ Mutante des B8 Isolates EL-H5 hergestellt, um einen neuen Ausgangsstamm für die Transformation der konstruierten pHel Plasmide zu besitzen. In jene Mutante konnte auch das Plasmid pHel274 transformiert werden. War der Wildtyp von B8 EL-H5 noch in der Lage zu kolonisieren, gelang es dessen Mutante B8 $\Delta cagA$ (Abb. 4.1) nicht mehr im Magen des Mongolischen Gerbils zu kolonisieren. Es wurde deshalb die Vermutung aufgestellt, dass das Produzieren von CagA einen essentiellen Kolonisierungsfaktor für den Stamm B8 darstellt. Gestützt werden konnte diese Hypothese durch folgenden Versuch: nach erneuter Transformation von pEL1 (Plasmid zur Herstellung von $\Delta cagA$ Mutanten) in *H. pylori* B8 wurden Gerbils mit einem Pool aller entstandenen Mutanten infiziert. Dieser Pool beinhaltet also auch solche Mutanten, bei welchen es bei der homologen Rekombination zwischen Plasmid und Genom zu einem *single strand crossover* gekommen ist. Dabei wird die zu transformierende Plasmidsequenz ins Genom eingebaut, ohne dabei einen Abschnitt der genomischen DNA zu ersetzen. In diesem Fall entstehen B8 Mutanten, die zwar die transformierte Selektionsresistenz zeigen aber weiterhin CagA translatieren. Aus zwei von vier infizierten Tieren konnten Reisolat gewonnen werden. Sechs dieser Reisolat wurden im Western Blot auf CagA untersucht und alle waren positiv. Mutanten die kein CagA mehr exprimieren, konnten nicht reisolat werden.

Wäre das CagA Protein ein essentieller Kolonisierungsfaktor für B8, so sollte die daraufhin angefertigte Mutante B8 $\Delta cagA$ + pHel274 wieder kolonisieren können, denn mit Transformation von pHel274 wird B8 $\Delta cagA$ zur Komplementationsmutante, da der *cagA* Genlocus sich auf dem Plasmid befindet und die Mutante CagA exprimiert. Jedoch kolonisierte die Mutante in keinem der vier infizierten Tiere. Dieselben Beobachtungen wurden bei einer zweiten Komplementationsmutante B8 $\Delta cagA$ + pHelcagAHA gemacht. Anhand dieser Versuche kann man nun schlussfolgern, dass *H. pylori* B8 nach Deletion des genomischen *cagA*-Locus nicht mehr im Gerbil kolonisieren kann.

Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens wurden daher weitere Wüstenrennmäuse mit folgenden B8 *cagA*-Mutanten infiziert: B8 $\Delta cagA\Delta$ Promotor (Hergestellt in der AG Rainer Haas, zusätzliche Deletion des von mRNA stark regulierten *cagA* Promotor [unpublizierte

Daten)], B8-15 (B8 Δ EPIYA::*rpsL-erm*) und B8 Δ EPIYA::HA (Abb. 4.1). Jeweils vier bis neun Tiere wurden mit diesen Mutanten infiziert. Aus den Tiermägen konnten jedoch keine *H. pylori* reisoliert werden.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass der *cagA*-positive Stamm B8 keine Deletionen seines genomischen *cagA* erlaubt, um im Gerbil kolonisieren zu können. Möglicherweise spielt dabei die 3' *repeat region* mit ihren EPIYA Motiven eine essentielle Rolle, da schon deren alleinige Deletion (wie in den Mutanten B8-15 und B8 Δ EPIYA::HA) ausreicht, um eine Kolonisierung im Gerbil zu verhindern. Dieses Verhalten ist für keinen anderen *H. pylori* Stamm bislang dokumentiert.

Ob dabei CagA in das Magenepithel injiziert werden kann oder nicht hat in Bezug auf die Kolonisierungsfähigkeit keinen Einfluss. B8 Δ *cagY* Mutanten, die über kein funktionsfähiges Typ-IV Sekretionssystem verfügen, kolonisieren weiterhin in der Wüstenrennmaus [114].

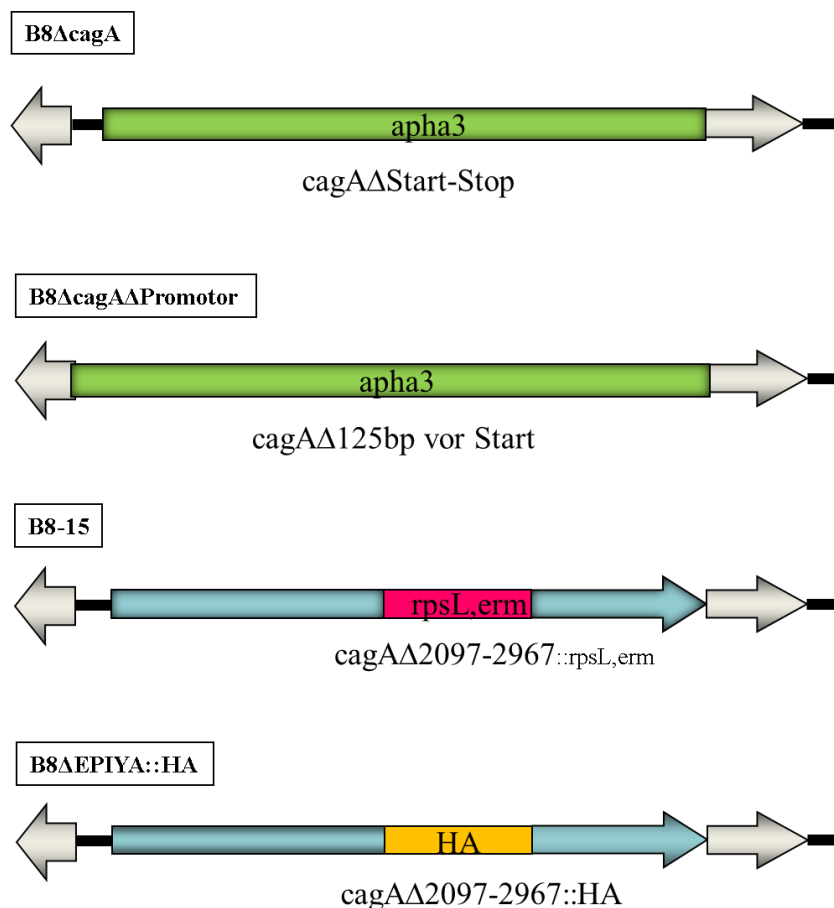


Abb. 4.1: B8 Δ *cagA* Mutanten, die nicht mehr im Gerbil kolonisieren

Dargestellt sind vier B8 Δ *cagA* Mutanten, deren *cagA* zu Teilen (Region der EPIYA Motive) oder komplett deletiert ist. Alle Klone haben die Fähigkeit zur Kolonisierung im Magen des Mongolischen Gerbil verloren. Die Konstrukte wurden in der AG Rainer Haas hergestellt.

In weiteren Infektionsexperimenten wurden drei Tiere mit einer B8 Mutante infiziert, die im *cagA* zwischen den Basen 1836 und 1837 eine *catGC* (Chloramphenicol-Resistenz) Kasseete enthält (Abb. 4.2). Diese Mutante exprimiert also kein funktionelles CagA, da es nach 1836 bp zum Abbruch der Translation kommt. Jedoch trägt das Bakterium weiterhin die komplette Sequenz des *cagA* Gens, ist also keine $\Delta cagA$ Mutante. Die Konstrukte konnten nach Töten der Tiere erfolgreich aus den Mägen reisoliert werden. In der Arbeit von Rieder *et al.* [90] wurde für diese Mutante eine 71 prozentige Kolonisierungsrate (10 von 14 Tiere) im Vergleich zu 89 % Kolonisation (17 von 19) des Wildtyps.

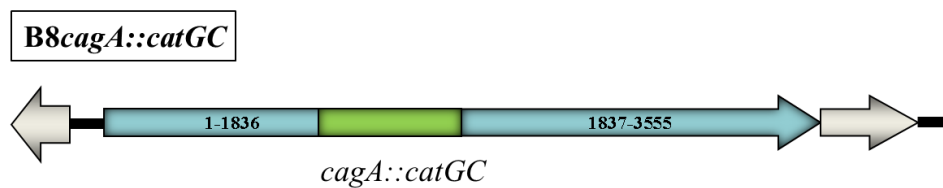


Abb. 4.2: B8 Mutante *cagA::catGC*

In das *cagA* dieser B8 Mutante wurde eine *catGC* Kasseete inseriert ohne dabei Teile des *cagA* zu deletieren. Diese Mutante besitzt weiterhin die Fähigkeit im Mongolischen Gerbil zu kolonisieren.

Im Gegensatz dazu sind andere *cagA*-positive Stämme wie G1.1 als *cagA*-Deletionsmutante, durchaus auch in der gleichen Quantität, noch in der Lage, im Gerbil zu kolonisieren [116]. Auch die $\Delta cagA$ Mutante des nigerianischen Patientenisolates 1-20A konnte von uns aus den Mägen von drei infizierten Gerbils reisoliert werden. Dieser Stamm toleriert also die Deletion des genomischen *cagA*-Allels.

Mutante	Kolonisierung im Gerbil
B8 $\Delta cagA$	0/7
B8 $\Delta cagA$ + Δ Promotor	0/5
B8 $\Delta cagA$ Pool	2/4 → Reisolate (6) aus beiden Tieren exprimieren CagA
B8 Δ EPIYA:: <i>rpsL-erm</i>	0/4
B8 Δ EPIYA:: <i>HA</i>	0/9
B8 $\Delta cagA$ + pHelcagAHA	0/4
B8 $\Delta cagA$ + pHel274	0/4
B8 <i>cagA::catGC</i>	3/3
1-20A $\Delta cagA$	3/3

Tab. 4.1: Kolonisierungsversuche der B8 (EL-H5) Deletionsmutanten

4.3 Einordnung der Arbeit im Kontext zur aktuellen Literatur

Die aktuellen Studien, die sich mit der Rolle der EPIYA Motive von CagA beschäftigen zeigen teilweise konträre Ergebnisse in der Frage, ob und wie sich die Anzahl der EPIYA Motive auf den Verlauf der *H. pylori* Infektion auswirkt. In einem iranischen Patientengut wurde gezeigt, dass eine steigende Anzahl an EPIYA-C Motiven in *western strain cagA* mit einer, im Vergleich zum Auftreten von Gastritiden, erhöhten Zahl an peptischen Ulcerationen und Magenkarzinomen einhergeht [95]. Eine ebenfalls 2013 publizierte Arbeit einer kolumbianischen Arbeitsgruppe hingegen kommt zu dem Ergebnis, dass mehr Kopien des EPIYA-C Motives in *cagA* keine Auswirkung auf Krankheits-assoziierte zelluläre Reaktion hat [33]. Viele der in dieser Studie aufgeführten Ergebnisse bestätigen diejenigen aus Kapitel 3.3 dieser Arbeit. Beispielsweise wurde nach Beimpfen von AGS-Zellen mit unterschiedlichen *H. pylori* Stämmen eine höhere IL-8 Ausschüttung der mit *cagPAI* positiven Stämmen infizierten Zellen beobachtet. Eine Korrelation der Anzahl der EPIYA Motive der *cagA* positiven Stämme und der Höhe der IL-8 Ausschüttung ergab sich dabei aber nicht. Ebenso induzierte der Stamm P272 der Karolinska-Isolate, der drei EPIYA Motive in *cagA* hat, im Mittel eine höhere IL-8 Ausschüttung als der mit vier EPIYA Motiven ausgestattete Stamm P270. Weitere Studien von Reyes-Leon *et al.* [88] und Sgouras *et al.* [101] kommen ebenfalls zu der Erkenntnis, dass IL-8 Induktion unabhängig von der Anzahl an EPIYA Wiederholungen in *cagA* ist. Wohingegen eine Arbeitsgruppe um Argent *et al.* eine direkte Assoziation zwischen IL-8 Expression und Anzahl an EPIYA Motiven beobachtet hat [7]. Möglicherweise spielt die geographische Herkunft der Isolate der verschiedenen Studien, die auch genomische Variabilität der Bakterien mit sich bringt, hier eine ausschlaggebende Rolle [2, 117].

Es wäre daher weiterhin interessant diese Studien mit Experimenten der in dieser Arbeit entworfenen *H. pylori* Mutanten in Zellinkubationsversuchen und im Tiermodell zu vergleichen.

In der Literatur findet sich wenig über die Faktoren, die *H. pylori* befähigen im Magen des Mongolischen Gerbils kolonisieren zu können. Durch die hier vorliegende Arbeit ist nicht erklärt, warum einige Stämme zur Kolonisierung befähigt sind und einige nicht. Zudem ist ungeklärt, ob CagA bzw. Abschnitte dessen entscheidend für die Kolonisierungsfähigkeit im Gerbil und somit wohl auch im Menschen ist. Im Fall von *H. pylori* B8 ist jedoch anzunehmen, dass die native genomische *cagA* Sequenz einen essentiellen Kolonisierungsfaktor im Gerbil-Modell darstellt.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass sich der *H. pylori* Stamm B8 nicht dazu eignet, um Mutationen seiner *cagA* 3' repeat region oder *cagA*-Deletionsmutanten herzustellen, um sie anschließend im Tiermodell auf Kolonisierungsfähigkeit, Infektiosität und Pathogenität zu untersuchen. Durch technische Probleme bei der Klonierungsarbeit und dem Verlust der Kolonisierungsfähigkeit der Deletionsmutanten im Tiermodell konnten keine funktionalen B8 Mutanten - zum einen mit fünf EPIYA Motiven und zum anderen mit fünf EPIFA Motiven - hergestellt werden. Bei der im Zuge der ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung verschiedener klinischer *H. pylori* Isolate stellte sich das nigerianische Patientenisolat 1-20A als geeigneter Ersatz für *H. pylori* B8 heraus. Die Transformation der Plasmide pHel274 und pHel275 in 1-20A sollte möglich sein. In Anbetracht der Tatsache, dass *cagA*-Deletionsmutanten von 1-20A weiter im Gerbil kolonisieren, ließen sich *in vivo* Experimente mit diesen Konstrukten durchführen. Zudem sollte auch mit diesem Stamm eine gerichtete Mutagenese des chromosomalen *cagA* unter Verwendung der *rpsL-erm*-Kassette versucht werden. Ein Nachteil in der Verwendung dieses Stammes bestünde sicherlich in der bedingt aussagekräftigen Vergleichbarkeit mit früheren Gerbil-Infektionsversuchen mit dem Stamm B8. Ein Vorteil wäre jedoch, dass der Stamm 1-20A *cagA* positiv und *vacA* Genotyp s1/m1 ist. Diese Art der Kombination der zwei Pathogenitätsfaktoren ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für peptische Ulcerationen und Magenkarzinomen bei infizierten Menschen vergesellschaftet [69] und deshalb äußerst interessant für tierexperimentelle Versuche.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das humanpathogene Bakterium *H. pylori* kolonisiert die Magenmukosa von etwa 50 % der Weltbevölkerung, wobei ca. 90 % der Infektionen klinisch stumm verlaufen. Komplikationen einer *H. pylori* Infektion sind chronische Gastritis, Ulcus ventriculi et duodeni, Magenkarzinom und gastrales MALT-Lymphom. Das von der *cag*-Pathogenitätsinsel kodierte Protein CagA aus *H. pylori*, ein immundominantes Antigen von ca. 130kDa, wird als Effektoronkoprotein durch den Cag Typ IV-Sekretionsapparat in verschiedene eukaryotische Zellen transloziert. Dort wird es anschließend an Tyrosinresten der EPIYA Motive phosphoryliert und löst in der Zielzelle eine Reihe von Effekten aus. Unklar ist weiterhin inwiefern sich eine Änderung der Anzahl der Phosphorylierungsmotive auf die Kolonisierungsfähigkeit, Infektiosität und Pathogenese der *H. pylori*-Infektion im etablierten Tiermodell des Mongolischen Gerbil auswirkt.

In dieser Arbeit wurden die Grundsteine für die Entwicklung von im Mongolischen Gerbil kolonisierenden *H. pylori* Klonen mit unterschiedlicher Anzahl an EPIYA Motiven gelegt. Der in unserer Arbeitsgruppe etablierte Versuchsstamm *H. pylori* B8 erwies sich dabei als ungeeignet. Einerseits war in diesem Stamm eine gerichtete Mutagenese der chromosomalen 3' *repeat region* von *cagA* mittel Kontraselektionsmethode nicht möglich, andererseits kam es bei *cagA*-(Teil-)Deletionsmutanten zum Verlust der Kolonisierungsfähigkeit in der Wüstenrennmaus. Deshalb ließen sich auch keine Komplementationsmutanten mit mutagenisiertem *cagA* mittels intrinsischem Plasmid herstellen.

Deshalb wurden in dieser Arbeit mehrere klinische *H. pylori*-Patientenisolate hinsichtlich der Kolonisierungsfähigkeit im Gerbil, der Typisierung, Produktion und Funktionalität der Virulenzfaktoren CagA und VacA und der Induktion einer Immunantwort in Form von IL-8 Ausschüttung in Zellinkubationsversuchen untersucht. Diese Charakterisierungen bilden die Grundlage für weitere Arbeiten mit den Isolaten, auch wenn es darum geht eine Alternative zu dem Stamm B8 für zukünftige Infektionsexperimente im Mongolischen Gerbil zu finden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 61 (1994) 1-241.
- [2] M. Achtman, T. Azuma, D.E. Berg, Y. Ito, G. Morelli, Z.J. Pan, S. Suerbaum, S.A. Thompson, A. van der Ende, L.J. van Doorn, Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions, *Mol Microbiol*, 32 (1999) 459-470.
- [3] M.R. Amieva, E.M. El-Omar, Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection, *Gastroenterology*, 134 (2008) 306-323.
- [4] M.R. Amieva, R. Vogelmann, A. Covacci, L.S. Tompkins, W.J. Nelson, S. Falkow, Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA, *Science*, 300 (2003) 1430-1434.
- [5] L.A. Anderson, S.J. Murphy, B.T. Johnston, R.G. Watson, H.R. Ferguson, K.B. Bamford, A. Ghazy, P. McCarron, J. McGuigan, J.V. Reynolds, H. Comber, L.J. Murray, Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy and the stages of the oesophageal inflammation, metaplasia, adenocarcinoma sequence: results from the FINBAR case-control study, *Gut*, 57 (2008) 734-739.
- [6] T. Ando, K. Kusugami, M. Ohsuga, M. Shinoda, M. Sakakibara, H. Saito, A. Fukatsu, S. Ichiyama, M. Ohta, Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori*-associated antral gastritis, *Am J Gastroenterol*, 91 (1996) 1150-1156.
- [7] R.H. Argent, J.L. Hale, E.M. El-Omar, J.C. Atherton, Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion, *J Med Microbiol*, 57 (2008) 1062-1067.
- [8] I.C. Arnold, N. Dehzad, S. Reuter, H. Martin, B. Becher, C. Taube, A. Muller, *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells, *J Clin Invest*, 121 (2011) 3088-3093.
- [9] J.C. Atherton, The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases, *Annu Rev Pathol*, 1 (2006) 63-96.
- [10] J.C. Atherton, P. Cao, R.M. Peek, Jr., M.K. Tummuru, M.J. Blaser, T.L. Cover, Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration, *J Biol Chem*, 270 (1995) 17771-17777.
- [11] J.C. Atherton, T.L. Cover, R.J. Twells, M.R. Morales, C.J. Hawkey, M.J. Blaser, Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*, *J Clin Microbiol*, 37 (1999) 2979-2982.

- [12] A.T. Axon, C.A. O'Morain, K.D. Bardhan, J.P. Crowe, A.D. Beattie, R.P. Thompson, P.M. Smith, F.D. Hollanders, J.H. Baron, D.A. Lynch, M.F. Dixon, D.S. Tompkins, H. Birrell, K.R. Gillon, Randomised double blind controlled study of recurrence of gastric ulcer after treatment for eradication of *Helicobacter pylori* infection, *BMJ*, 314 (1997) 565-568.
- [13] S. Backert, S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, T.F. Meyer, Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells, *Mol Microbiol*, 42 (2001) 631-644.
- [14] S. Backert, E. Ziska, V. Brinkmann, U. Zimny-Arndt, A. Fauconnier, P.R. Jungblut, M. Naumann, T.F. Meyer, Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus, *Cell Microbiol*, 2 (2000) 155-164.
- [15] N. Banatvala, K. Mayo, F. Megraud, R. Jennings, J.J. Deeks, R.A. Feldman, The cohort effect and *Helicobacter pylori*, *J Infect Dis*, 168 (1993) 219-221.
- [16] D. Basso, C.F. Zambon, D.P. Letley, A. Stranges, A. Marchet, J.L. Rhead, S. Schiavon, G. Guariso, M. Ceroti, D. Nitti, M. Rugge, M. Plebani, J.C. Atherton, Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms, *Gastroenterology*, 135 (2008) 91-99.
- [17] M.P. Bergman, A. Engering, H.H. Smits, S.J. van Vliet, A.A. van Bodegraven, H.P. Wirth, M.L. Kapsenberg, C.M. Vandenbroucke-Grauls, Y. van Kooyk, B.J. Appelmelk, *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN, *J Exp Med*, 200 (2004) 979-990.
- [18] J.A. Bustamante-Rengifo, A.J. Matta, A. Pazos, L.E. Bravo, In vitro effect of amoxicillin and clarithromycin on the 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates, *World journal of gastroenterology : WJG*, 19 (2013) 6044-6054.
- [19] Y. Churin, L. Al-Ghoul, O. Kepp, T.F. Meyer, W. Birchmeier, M. Naumann, *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response, *J Cell Biol*, 161 (2003) 249-255.
- [20] A. Covacci, S. Falkow, D.E. Berg, R. Rappuoli, Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*?, *Trends Microbiol*, 5 (1997) 205-208.
- [21] A. Covacci, R. Rappuoli, Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell, *J Exp Med*, 191 (2000) 587-592.
- [22] A. Covacci, J.L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, R. Rappuoli, *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography, *Science*, 284 (1999) 1328-1333.
- [23] T.L. Cover, S.R. Blanke, *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality, *Nat Rev Microbiol*, 3 (2005) 320-332.
- [24] J.E. Crabtree, A. Covacci, S.M. Farmery, Z. Xiang, D.S. Tompkins, S. Perry, I.J.

Lindley, R. Rappuoli, *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype, *J Clin Pathol*, 48 (1995) 41-45.

[25] A.F. Cutler, S. Havstad, C.K. Ma, M.J. Blaser, G.I. Perez-Perez, T.T. Schubert, Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection, *Gastroenterology*, 109 (1995) 136-141.

[26] D. Dailidienė, G. Dailidė, D. Kersulytė, D.E. Berg, Contraselectable streptomycin susceptibility determinant for genetic manipulation and analysis of *Helicobacter pylori*, *Appl Environ Microbiol*, 72 (2006) 5908-5914.

[27] A. Dubois, N. Fiala, L.M. Heman-Ackah, E.S. Drazek, A. Tarnawski, W.N. Fishbein, G.I. Perez-Perez, M.J. Blaser, Natural gastric infection with *Helicobacter pylori* in monkeys: a model for spiral bacteria infection in humans, *Gastroenterology*, 106 (1994) 1405-1417.

[28] B.E. Dunn, H. Cohen, M.J. Blaser, *Helicobacter pylori*, *Clin Microbiol Rev*, 10 (1997) 720-741.

[29] E.M. El-Omar, M. Carrington, W.H. Chow, K.E. McColl, J.H. Bream, H.A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C.C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J.F. Fraumeni, Jr., C.S. Rabkin, Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer, *Nature*, 404 (2000) 398-402.

[30] A. Elfvin, I. Bolin, C. Von Bothmer, M. Stolte, H. Watanabe, L. Fandriks, M. Vieth, *Helicobacter pylori* induces gastritis and intestinal metaplasia but no gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils, *Scand J Gastroenterol*, 40 (2005) 1313-1320.

[31] Y. Elitsur, L. Adkins, D. Saeed, C. Neace, *Helicobacter pylori* antibody profile in household members of children with H. pylori infection, *J Clin Gastroenterol*, 29 (1999) 178-182.

[32] E. Engvall, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry*, 8 (1971) 871-874.

[33] C.A. Fajardo, A.J. Quiroga, A. Coronado, K. Labrador, N. Acosta, P. Delgado, C. Jaramillo, M.M. Bravo, CagA EPIYA polymorphisms in Colombian *Helicobacter pylori* strains and their influence on disease-associated cellular responses, *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 5 (2013) 50-59.

[34] R.A. Feldman, A.J. Eccersley, J.M. Hardie, Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio, *Br Med Bull*, 54 (1998) 39-53.

[35] G.S. Feng, T. Pawson, Phosphotyrosine phosphatases with SH2 domains: regulators of signal transduction, *Trends Genet*, 10 (1994) 54-58.

[36] W. Fischer, B. Gebert, R. Haas, Novel activities of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from epithelial cells towards the immune system, *Int J Med Microbiol*, 293 (2004)

539-547.

[37] J.G. Fox, M. Batchelder, R. Marini, L. Yan, L. Handt, X. Li, B. Shames, A. Hayward, J. Campbell, J.C. Murphy, *Helicobacter pylori*-induced gastritis in the domestic cat, *Infect Immun*, 63 (1995) 2674-2681.

[38] T. Fujioka, S. Honda, M. Tokieda, *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma in animal models, *J Gastroenterol Hepatol*, 15 Suppl (2000) D55-59.

[39] R.J. Gorrell, J. Guan, Y. Xin, M.A. Tafreshi, M.L. Hutton, M.A. McGuckin, R.L. Ferrero, T. Kwok, A novel NOD1- and CagA-independent pathway of interleukin-8 induction mediated by the *Helicobacter pylori* type IV secretion system, *Cell Microbiol*, (2012).

[40] S.G. Grant, J. Jessee, F.R. Bloom, D. Hanahan, Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1990) 4645-4649.

[41] J. Hacker, G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, H. Tschape, Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution, *Mol Microbiol*, 23 (1997) 1089-1097.

[42] D. Hanahan, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol*, 166 (1983) 557-580.

[43] M. Hatakeyama, Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein, *Nature reviews. Cancer*, 4 (2004) 688-694.

[44] M. Hatakeyama, [Oncogenic mechanism of *Helicobacter pylori*], *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 31 (2008) 132-140.

[45] T. Hayashi, M. Senda, H. Morohashi, H. Higashi, M. Horio, Y. Kashiba, L. Nagase, D. Sasaya, T. Shimizu, N. Venugopalan, H. Kumeta, N.N. Noda, F. Inagaki, T. Senda, M. Hatakeyama, Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA, *Cell Host & Microbe*, 12 (2012) 20-33.

[46] S.L. Hazell, D.J. Evans, Jr., D.Y. Graham, *Helicobacter pylori* catalase, *J Gen Microbiol*, 137 (1991) 57-61.

[47] H. Higashi, A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, M. Hatakeyama, *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation, *J Biol Chem*, 279 (2004) 17205-17216.

[48] H. Higashi, R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, M. Hatakeyama, Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002) 14428-14433.

- [49] F. Hirayama, S. Takagi, H. Kusuvara, E. Iwao, Y. Yokoyama, Y. Ikeda, Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*, J Gastroenterol, 31 (1996) 755-757.
- [50] H. Hoffelner, R. Haas, Recombinant bacterial ghosts: versatile targeting vehicles and promising vaccine candidates, Int J Med Microbiol, 294 (2004) 303-311.
- [51] M.H. Houben, D. van de Beek, E.F. Hensen, A.J. de Craen, E.A. Rauws, G.N. Tytgat, A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy--the impact of antimicrobial resistance on eradication rates, Aliment Pharmacol Ther, 13 (1999) 1047-1055.
- [52] E. Iwao, F. Hirayama, S. Takagi, Y. Yokoyama, Y. Ikeda, Virulence factors of *Helicobacter pylori* affecting its gastric colonization in Mongolian gerbils, J Gastroenterol, 34 Suppl 11 (1999) 47-54.
- [53] B. Kaplan-Turkoz, L.F. Jimenez-Soto, C. Dian, C. Ertl, H. Remaut, A. Louche, T. Tosi, R. Haas, L. Terradot, Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with beta1 integrin, Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (2012) 14640-14645.
- [54] A.L.S. Karl J. Field, The Laboratory HAMSTER & GERBIL, Boca Ranton, 1999.
- [55] P.D. Klein, D.Y. Graham, A. Gaillour, A.R. Opekun, E.O. Smith, Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group, Lancet, 337 (1991) 1503-1506.
- [56] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, H.G. Khorana, Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases, J Mol Biol, 56 (1971) 341-361.
- [57] M. Kodama, K. Murakami, R. Sato, T. Okimoto, A. Nishizono, T. Fujioka, *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis, World journal of gastroenterology : WJG, 11 (2005) 7063-7071.
- [58] J.G. Kusters, Recent developments in *Helicobacter pylori* vaccination, Scand J Gastroenterol Suppl, (2001) 15-21.
- [59] J.G. Kusters, A.H. van Vliet, E.J. Kuipers, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, Clin Microbiol Rev, 19 (2006) 449-490.
- [60] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 680-685.
- [61] J.R. Lambert, M. Borromeo, K.J. Pinkard, H. Turner, C.B. Chapman, M.L. Smith, Colonization of gnotobiotic piglets with *Campylobacter pyloridis*--an animal model?, J Infect Dis, 155 (1987) 1344.
- [62] R.D. Leunk, P.T. Johnson, B.C. David, W.G. Kraft, D.R. Morgan, Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*, J Med Microbiol, 26 (1988) 93-99.

- [63] H. Leying, S. Suerbaum, G. Geis, R. Haas, Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene, *Mol Microbiol*, 6 (1992) 2863-2874.
- [64] H.M. Malaty, D.Y. Graham, Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection, *Gut*, 35 (1994) 742-745.
- [65] P. Malfertheiner, [Guidelines for the diagnosis and treatment of H. pylori infection], *MMW Fortschr Med*, 145 (2003) 42-45.
- [66] S. Manes, E. Mira, C. Gomez-Mouton, Z.J. Zhao, R.A. Lacalle, A.C. Martinez, Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility, *Mol Cell Biol*, 19 (1999) 3125-3135.
- [67] B.J. Marshall, J.A. Armstrong, D.B. McGeachie, R.J. Glancy, Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter, *Med J Aust*, 142 (1985) 436-439.
- [68] B.J. Marshall, J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet*, 1 (1984) 1311-1315.
- [69] J.I. Matos, H.A. de Sousa, R. Marcos-Pinto, M. Dinis-Ribeiro, *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis, *European journal of gastroenterology & hepatology*, 25 (2013) 1431-1441.
- [70] S. Matsumoto, Y. Washizuka, Y. Matsumoto, S. Tawara, F. Ikeda, Y. Yokota, M. Karita, Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection, *J Med Microbiol*, 46 (1997) 391-397.
- [71] R.A. Medina, B. Manicassamy, S. Stertz, C.W. Seibert, R. Hai, R.B. Belshe, S.E. Frey, C.F. Basler, P. Palese, A. Garcia-Sastre, Pandemic 2009 H1N1 vaccine protects against 1918 Spanish influenza virus, *Nat Commun*, 1 (2010) 28.
- [72] F. Megraud, Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology*, 115 (1998) 1278-1282.
- [73] T. Mine, H. Muraoka, T. Saika, I. Kobayashi, Characteristics of a clinical isolate of urease-negative *Helicobacter pylori* and its ability to induce gastric ulcers in Mongolian gerbils, *Helicobacter*, 10 (2005) 125-131.
- [74] H.M. Mitchell, P. Hu, Y. Chi, M.H. Chen, Y.Y. Li, S.L. Hazell, A low rate of reinfection following effective therapy against *Helicobacter pylori* in a developing nation (China), *Gastroenterology*, 114 (1998) 256-261.
- [75] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1 (1986) 263-273.
- [76] N. Murata-Kamiya, Pathophysiological functions of the CagA oncoprotein during infection by *Helicobacter pylori*, *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 13 (2011) 799-807.

- [77] F. Naja, N. Kreiger, T. Sullivan, *Helicobacter pylori* infection in Ontario: prevalence and risk factors, *Can J Gastroenterol*, 21 (2007) 501-506.
- [78] S. Odenbreit, J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, R. Haas, Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion, *Science*, 287 (2000) 1497-1500.
- [79] S. Odenbreit, B. Wieland, R. Haas, Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain, *J Bacteriol*, 178 (1996) 6960-6967.
- [80] N. Ohnishi, H. Yuasa, S. Tanaka, H. Sawa, M. Miura, A. Matsui, H. Higashi, M. Musashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, G. Yamada, T. Azuma, M. Hatakeyama, Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 1003-1008.
- [81] K.M. Ottemann, A.C. Lowenthal, *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection, *Infect Immun*, 70 (2002) 1984-1990.
- [82] J. Parsonnet, *Helicobacter pylori*: the size of the problem, *Gut*, 43 Suppl 1 (1998) S6-9.
- [83] J. Parsonnet, G.D. Friedman, N. Orentreich, H. Vogelman, Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection, *Gut*, 40 (1997) 297-301.
- [84] M. Poppe, S.M. Feller, G. Romer, S. Wessler, Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility, *Oncogene*, 26 (2007) 3462-3472.
- [85] J. Puls, W. Fischer, R. Haas, Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells, *Mol Microbiol*, 43 (2002) 961-969.
- [86] D.A. Rasko, D.R. Webster, J.W. Sahl, A. Bashir, N. Boisen, F. Scheutz, E.E. Paxinos, R. Sebra, C.S. Chin, D. Iliopoulos, A. Klammer, P. Peluso, L. Lee, A.O. Kislyuk, J. Bullard, A. Kasarskis, S. Wang, J. Eid, D. Rank, J.C. Redman, S.R. Steyert, J. Frimodt-Moller, C. Struve, A.M. Petersen, K.A. Krogfelt, J.P. Nataro, E.E. Schadt, M.K. Waldor, Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany, *N Engl J Med*, 365 (2011) 709-717.
- [87] J. Renart, J. Reiser, G.R. Stark, Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (1979) 3116-3120.
- [88] A. Reyes-Leon, J.C. Atherton, R.H. Argent, J.L. Puente, J. Torres, Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene, *Infect Immun*, 75 (2007) 3445-3454.
- [89] J.L. Rhead, D.P. Letley, M. Mohammadi, N. Hussein, M.A. Mohagheghi, M. Eshagh

Hosseini, J.C. Atherton, A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer, *Gastroenterology*, 133 (2007) 926-936.

[90] G. Rieder, J.L. Merchant, R. Haas, *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils, *Gastroenterology*, 128 (2005) 1229-1242.

[91] E. Roma, J. Panayiotou, J. Pachoula, Y. Kafritsa, C. Constantinidou, A. Mentis, V. Syriopoulou, Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori* infection in Greece, *J Clin Gastroenterol*, 43 (2009) 711-715.

[92] M. Rowland, D. Kumar, L. Daly, P. O'Connor, D. Vaughan, B. Drumm, Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children, *Gastroenterology*, 117 (1999) 336-341.

[93] J. Rudi, C. Kolb, M. Maiwald, D. Kuck, A. Sieg, P.R. Galle, W. Stremmel, Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases, *J Clin Microbiol*, 36 (1998) 944-948.

[94] M.F. Rupnow, R.D. Shachter, D.K. Owens, J. Parsonnet, A dynamic transmission model for predicting trends in *Helicobacter pylori* and associated diseases in the United States, *Emerg Infect Dis*, 6 (2000) 228-237.

[95] B.A. Salih, A. Guner, A. Karademir, M. Uslu, M.A. Ovali, D. Yazici, B.K. Bolek, S. Arikan, Evaluation of the effect of cagPAI genes of *Helicobacter pylori* on AGS epithelial cell morphology and IL-8 secretion, *Antonie van Leeuwenhoek*, (2013).

[96] W. Schmitt, R. Haas, Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein, *Mol Microbiol*, 12 (1994) 307-319.

[97] B.G. Schneider, M.B. Piazuelo, L.A. Sicinski, R. Mera, D.F. Peng, J.C. Roa, J. Romero-Gallo, A.G. Delgado, T. de Sablet, L.E. Bravo, K.T. Wilson, W. El-Rifai, R.M. Peek, Jr., P. Correa, Virulence of infecting *Helicobacter pylori* strains and intensity of mononuclear cell infiltration are associated with levels of DNA hypermethylation in gastric mucosae, *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 8 (2013).

[98] S. Schreiber, M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H.O. Werling, C. Josenhans, S. Suerbaum, The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 5024-5029.

[99] E.D. Segal, J. Cha, J. Lo, S. Falkow, L.S. Tompkins, Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) 14559-14564.

[100] M. Selbach, S. Moese, C.R. Hauck, T.F. Meyer, S. Backert, Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo, *J Biol Chem*, 277 (2002) 6775-6778.

- [101] D.N. Sgouras, E.G. Panayotopoulou, K. Papadakos, B. Martinez-Gonzalez, A. Roumbani, J. Panayiotou, C. vanVliet-Constantinidou, A.F. Mentis, E. Roma-Giannikou, CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children, *J Clin Microbiol*, 47 (2009) 2426-2434.
- [102] T. Shimizu, T. Akamatsu, A. Sugiyama, H. Ota, T. Katsuyama, *Helicobacter pylori* and the surface mucous gel layer of the human stomach, *Helicobacter*, 1 (1996) 207-218.
- [103] P. Sipponen, T. Helske, P. Jarvinen, H. Hyvarinen, K. Seppala, M. Siurala, Fall in the prevalence of chronic gastritis over 15 years: analysis of outpatient series in Finland from 1977, 1985, and 1992, *Gut*, 35 (1994) 1167-1171.
- [104] G.M. Sobala, J.E. Crabtree, M.F. Dixon, C.J. Schorah, J.D. Taylor, B.J. Rathbone, R.V. Heatley, A.T. Axon, Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations, *Gut*, 32 (1991) 1415-1418.
- [105] M. Sozzi, M. Valentini, N. Figura, P. De Paoli, R.M. Tedeschi, A. Gloghini, D. Serraino, M. Poletti, A. Carbone, Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* infection: the role of CagA status, *Am J Gastroenterol*, 93 (1998) 375-379.
- [106] M. Stein, F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W.J. Fantl, A. Covacci, c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs, *Mol Microbiol*, 43 (2002) 971-980.
- [107] M. Stein, R. Rappuoli, A. Covacci, Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 1263-1268.
- [108] S. Suerbaum, P. Michetti, *Helicobacter pylori* infection, *N Engl J Med*, 347 (2002) 1175-1186.
- [109] A. Takahashi, R. Tsutsumi, I. Kikuchi, C. Obuse, Y. Saito, A. Seidi, R. Karisch, M. Fernandez, T. Cho, N. Ohnishi, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, B.G. Neel, M. Hatakeyama, SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver, *Mol Cell*, 43 (2011) 45-56.
- [110] M. Tartaglia, B.D. Gelb, Germ-line and somatic PTPN11 mutations in human disease, *European journal of medical genetics*, 48 (2005) 81-96.
- [111] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (1979) 4350-4354.
- [112] S. Wen, S.F. Moss, *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis, *Cancer letters*, 282 (2009) 1-8.
- [113] T. Wex, M. Venerito, J. Kreutzer, T. Gotze, A. Kandulski, P. Malfertheiner, Serological

prevalence of *Helicobacter pylori*-infection in Saxony-Anhalt, Germany in 2010, Clin Vaccine Immunol, (2011).

[114] T. Wiedemann, E. Loell, S. Mueller, M. Stoeckelhuber, M. Stolte, R. Haas, G. Rieder, *Helicobacter pylori* cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils, PLoS One, 4 (2009) e4754.

[115] J.G. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res, 18 (1990) 6531-6535.

[116] H.P. Wirth, M.H. Beins, M. Yang, K.T. Tham, M.J. Blaser, Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains, Infect Immun, 66 (1998) 4856-4866.

[117] T. Wirth, X. Wang, B. Linz, R.P. Novick, J.K. Lum, M. Blaser, G. Morelli, D. Falush, M. Achtman, Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh, Proc Natl Acad Sci U S A, 101 (2004) 4746-4751.

[118] A.C. Wotherspoon, *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma, Br Med Bull, 54 (1998) 79-85.

[119] Y. Yamaoka, H.M. El-Zimaity, O. Gutierrez, N. Figura, J.G. Kim, T. Kodama, K. Kashima, D.Y. Graham, Relationship between the cagA 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH, Gastroenterology, 117 (1999) 342-349.

[120] H. Yoshiyama, H. Nakamura, M. Kimoto, K. Okita, T. Nakazawa, Chemotaxis and motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment, J Gastroenterol, 34 Suppl 11 (1999) 18-23.

[121] D.H. Yu, C.K. Qu, O. Henegariu, X. Lu, G.S. Feng, Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion, J Biol Chem, 273 (1998) 21125-21131.

[122] Q. Zheng, X.Y. Chen, Y. Shi, S.D. Xiao, Development of gastric adenocarcinoma in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*, J Gastroenterol Hepatol, 19 (2004) 1192-1198.

7 ANHANG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	anti
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AGS	engl.: <i>gastric adenocarcinoma</i>
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Aqua dest.	Aqua destillata
BB	engl.: <i>brucella broth</i> (Brucella Medium)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CagA	Cytotoxin-assoziiertes Gen A
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleid acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Glutaminsäure
EDTA	engl.: <i>ethylendiamintetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
I	Isoleucin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani
MKI	Mark-Kinase Inhibitor
m.o.i	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOAc	Natriumacetat
NBT	Nitrotetrazoliumblauschwarz
OD	Optische Dichte
P	Prolin
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Ketten Reaktion)
p.i.	lat.: <i>post infectionem</i>
POX	Meerrettichperoxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
x ^R	x-resistent
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
RT	Raumtemperatur
x ^S	x-sensibel
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumduodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
T4SS	<i>Helicobacter pylori</i> Typ IV Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	hitze-stabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris(-HCl)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(hydrochlorid)
<i>vacA</i>	Gen von VacA
VacA	Vacuolating cytotoxin A
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
Y	Tyrosin
Einheiten	
A	Ampere
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CFU	engl.: <i>colony forming unit</i> (koloniebildende Einheit)
g	Gramm

h	Stunde
l	Liter
m	Meter
min	Minute
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt
Vorsätze	
k	kilo 10^3
m	milli 10^{-3}
μ	mikro 10^{-6}
n	nano 10^{-9}
p	piko 10^{-12}

8 DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Haas der mit leitender Hand und stets offenem Ohr die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Auch PD Dr. Wolfgang Fischer möchte ich für seinen fortwährend praktischen Rat danken.

Ebenso zu großem Dank verpflichtet bin ich Dr. Ute Breithaupt und Eva Löll, ohne deren immense Unterstützung es diese Arbeit nicht geben würde.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Haas für jede kleine und große Hilfe, jedes inspirierende Gespräch und die gute Atmosphäre im Labor.

Ein Dankeschön auch den Mitarbeitern des Tierstalls des Max von Pettenkofer-Institutes.

Aus allertiefstem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden in der Nähe und in der Ferne.



Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Die Rolle der Tyrosinphosphorylierungsmotive des Onkoproteins CagA von *Helicobacter pylori*“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den

Florian Gilg